

STRUKTURVERÄNDERUNGEN
AN SKELETTMUSKELGEWEBE
VOM RIND NACH KÄLTEEINWIRKUNG:
EIN HISTOLOGISCHER VERGLEICH
ZWISCHEN GELAGERTEM FRISCHFLEISCH
UND MEHRFACH AUFGETAUTEM
GEFRIERFLEISCH

Angelika Felber

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546201_0015

Aus dem
Institut für Tieranatomie
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. H.G. Liebich

STRUKTURVERÄNDERUNGEN AN SKELETTMUSKELGEWEBE VOM RIND NACH
KALTEEINWIRKUNG: EIN HISTOLOGISCHER VERGLEICH ZWISCHEN GELAGERTEM
FRISCHFLEISCH UND MEHRFACH AUFGETAUTEM GEFRIERFLEISCH

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Angelika Felber
aus
Olching

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. H.G. Liebich

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. Ch. Ring

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2 - 27
2.1. Feinstruktur des Muskelgewebes	2 - 9
2.2. Lektine	9 - 11
2.3. Physiologische und biochemische Grundlagen der Muskelkontraktion	12 - 14
2.4. Postmortale Veränderungen im Muskelgewebe	14 - 22
2.5. Gefrieränderungen	22 - 27
3. MATERIAL UND METHODE	28 - 33
3.1. Untersuchungsmaterial	28 - 29
3.2. Strukturelle Untersuchungsmethoden	30 - 33
4. ERGEBNIS	34 - 70
4.1. Lichtmikroskopische Untersuchung	34 - 52
4.2. Fluoreszenzmikroskopische Unter- suchung	52 - 55
4.3. Elektronenmikroskopische Unter- suchung	56 - 70
5. DISKUSSION	71 - 76
6. ZUSAMMENFASSUNG	77 - 78
7. SUMMARY	79 - 80
8. LITERATURVERZEICHNIS	81 - 91

1. EINLEITUNG

Seit 1981 schreibt der Gesetzgeber die Deklaration von aufgetautem Gefrierfleisch zwingend vor. In diesem Zusammenhang benötigt die Lebensmittelüberwachung Nachweismethoden, um den Verbraucher vor Falschdeklaration zu schützen. Kommerziell praktizierte Gefrier- und Auftauvorgänge von Fleisch lassen sich bis heute nicht mit hinreichender Sicherheit erfassen. Bislang bieten sich allein zwei methodische Ansätze an:

- 1) die enzymatische Analyse von Veränderungen des Muskelgewebes mit biochemisch-serologischen Methoden
- 2) die morphologische Beurteilung des Muskelgewebes mit histologischen Methoden

Die prinzipielle Anwendbarkeit beider Nachweisverfahren wurde in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen unter der Annahme nachgewiesen, daß die gesetzlich vorgeschriebene eintägige Vorkühlphase tatsächlich eingehalten wird. Dies ist jedoch in der täglichen Praxis - bedingt durch marktwirtschaftliche Überlegungen - oftmals eher der Ideal- als der Regelfall. Detaillierte Untersuchungen zur Frage struktureller Veränderungen an aufgetautem Gefrierfleisch in Abhängigkeit von der Lagerdauer der Proben fehlen bislang. Ebenso sind Angaben zur Struktur des Muskelgewebes nach erneutem Gefrieren bereits vormals gefrorener und aufgetauter Fleischproben nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit sollte sein, die Anwendbarkeit morphologischer Methoden zum Nachweis von aufgetautem Gefrierfleisch unter möglichst praxisnahen Bedingungen zu überprüfen und die Auswirkungen von Lagerungszeiten und Doppelgefrieren auf Fleisch histologisch zu beurteilen.

2. LITERATUR

2.1. Feinstruktur des Muskelgewebes

2.1.1. Übersicht

Die quergestreifte Muskulatur der Vertebraten besteht aus überwiegend parallel angeordneten Muskelfasern mit einer Länge von bis zu mehreren Zentimetern und einem Durchmesser von 10 bis 100 μm . Jede Muskelfaser wird von einer bindegewebigen Hülle umgeben, welche die einzelnen Fasern in Bündeln, den sogenannten primären Faszikeln, zusammenfaßt. Diese können bis zu mehreren hundert Fasern enthalten. Mehrere dieser Bündel vereinigen sich und bilden die sekundären und tertiären Faszikel. Vom Epimysium aus ziehen Ausläufer zwischen die primären, sekundären und tertiären Faszikel. Diese aus kollagenem und retikulärem Bindegewebe, sowie dazwischen gelagerten Fettzellen zusammengesetzten Strukturen bilden das Perimysium. In diese bindegewebige Schelde eingelagert liegen Blut- und Lymphgefäße, sowie Nerven. Jede einzelne Muskelfaser wird von einem feinen Netz von Bindegewebsfasern umhüllt. In diesem, dem Endomysium, liegen Nervenfasern, Fibroblasten, Histiozyten, Mastzellen und Kapillaren. Das Kapillarnetz der Muskelfasern liegt der Oberfläche der Muskelzellen dicht an. Die Kapillaren verlaufen im entspannten Zustand längs zur Faserrichtung, im kontrahierten Zustand geschlängelt.

2.1.2. Feinstruktur der Muskelfasern

Muskelfasern stellen vielkernige Riesenzellen dar (Bargmann, 1977), die außer zellüblichen Organellen wie Mitochondrien, Golgi-System, Kern, Glykogengranula zusätzlich spezifisch differenzierte Zellbestandteile enthalten. Bei diesen handelt es sich um die quergestreiften Myofibrillen, um das mit dem Sarkolemm in direkter Verbindung stehende transversale Tubulussystem (T-System) und um das sarkoplasmatische Retikulum.

2.1.2.1. Sarkolemm

Die Muskelzellen werden von einer feinen Oberflächenmembran, dem Sarkolemm, welches erstmals 1840 von Bowman lichtmikroskopisch beschrieben wurde, umhüllt. Dieses besteht nach Mauro und Adams (1961) aus 4 Schichten: der Basalmembran, einem Flechtwerk aus Kollagenfibrillen, einer äußeren Schicht feiner Filamente und dem Plasmalemm. Bargmann (1977) unterscheidet zwischen der unmittelbar der Zelle aufliegenden Plasmamembran, welche er als das Sarkolemm im engeren Sinne bezeichnet, und dem darüber liegenden Myolemm, welches sich aus der Basalmembran und darüber liegenden argyrophilen Fasern zusammensetzt.

In vivo grenzt das Plasmalemm die Muskelzelle allseitig von der Umgebung ab. Diese innere Lipiddoppelmembran enthält zusätzlich eine Reihe von Struktur- und Rezeptorproteinen sowie metabolisch aktive

Proteine (Dubowitz, 1985). Unter anderem finden sich Proteine wie Vinculin und Spectrin (Appleyard et al., 1984; Pardo et al., 1983). Neben den Proteinkomponenten sind in das Plasmalemm verschiedene Proteoglykane eingelagert. Diese enthalten als Kohlehydratkomponente Substanzen wie N-Azetylglukosamin, Galaktose und Mannose. Der Nachweis derartiger Gruppen erfolgt entweder unspezifisch mit Schiff'schem Reagenz oder Ruthenium-Rot-Färbung (Methodische Übersicht bei Zacks et al., 1973) oder gruppenspezifisch unter Verwendung von Lektinen (Goldstein und Hayes, 1978; Rubenstein et al., 1979; Sanes und Cheney, 1982; Dunn et al., 1982). Das Plasmalemm setzt sich in die Muskelfaser in Form des sogenannten T-Systems fort und steht mit den weiter unten beschriebenen Z-Linien über Desminfilamente (Lazarides, 1980; Tokoyasu et al., 1983) in Verbindung.

2.1.2.2. Muskelfaserkerne

Die Anzahl der Muskelfaserkerne beträgt pro Millimeter ungefähr 28 - 40 Kerne. Bei Säugetieren liegen diese überwiegend subsarkolemmal. In Sehnenansatznähe kommen etwas vermehrt zentrale Kerne vor. Die Gestalt der Kerne ist linsen- oder spindelförmig. Die Länge beträgt ungefähr 6 - 15 μm , die Breite 1 - 3 μm . Die Muskelkerne enthalten 1 bis 2 Nukleoli, deren Größe in Abhängigkeit von der Syntheseaktivität der Zelle variiert (Romen und Altmann, 1977).

2.1.2.3. Golgi Apparat

In Nachbarschaft der Kerne liegen die Golgi-Komplexe. Einige enthalten Vakuolen und kleine Vesikel mit klarem oder mäßig dichtem Inhalt. Daneben liegen kleine membranumhüllte sphärische sarkoplasmatische Granula (Bargmann, 1977).

2.1.2.4. Mitochondrien

Die Mitochondrien stellen überwiegend längsovale, teils subsarkolemmal, teils zwischen den Myofibrillen gelagerte Zellorganellen dar. Sie werden von einer glatten, etwa 8 nm messenden äußeren Membran umhüllt. Diese ist im Inneren durch einen etwa 7 nm breiten hellen Raum von einer zweiten Membran, der Innenmembran, getrennt (Ernster und Schatz, 1981). Diese innere Membran zeigt Cristae mitochondriales, die sich in das Innere des Mitochondriums erstrecken und so einen Matrix- und Intracristaeraum entstehen lassen. Die Cristae mitochondriales weisen eine unterschiedliche Länge auf und bilden eine Reihe unvollständiger Quersepten. Der schmale Spalt zwischen innerer und äußerer Grenzmembran ist elektronenoptisch leer. Der Raum innerhalb der inneren Membran wird von der homogenen oder feingranulierten mitochondrialen Matrix ausgefüllt.

Die Mitochondrien enthalten zahlreiche Enzymsysteme der inneren Atmung und der Energiebereitstellung. Als Beispiele seien erwähnt die



Enzyme der Atmungskette, welche im Bereich der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind; die Adenylatkinase zur Synthese von energiereichen Phosphaten im Raum zwischen innerer und äußerer Membran und die Monoaminoxidase im Bereich der äußeren Membran. Eine Übersicht über die biochemische Struktur der Mitochondrien findet sich bei Lee und Martens (1986).

2.1.2.5. Innere Membransysteme der Muskelfaser

Im Inneren der einzelnen Muskelfasern finden sich zwei strukturell unabhängige, funktionell jedoch gekoppelte Membransysteme, das sarkoplasmatische Retikulum und das T-System. Das sarkoplasmatische Retikulum stellt ein longitudinales, gefenstertes Schlauchsystem dar, welches sich um die einzelnen Myofibrillen lagert (Dubowitz, 1985) und ungefähr 5 - 10 % des Volumens der Muskelfaser einnimmt (Peachy, 1965). Es scheint keinen direkten Kontakt mit dem Extrazellularraum zu besitzen (Eisenberg, 1983). Das sarkoplasmatische Retikulum enthält im Inneren vor allem Calcium-Magnesium-abhängige ATPase (Jorgensen et al., 1979), sowie Calcium. Das sarkoplasmatische Retikulum dient überwiegend der Regulation der Calciumkonzentration der Muskelzelle (Hasselbach, 1977). An den Enden, im Bereich der Terminalzisternen ist das sarkoplasmatische Retikulum erweitert. In diesem Bereich, welcher am Übergang von A- zu I-Bande liegt, finden sich, jeweils zwischen zwei Terminalzisternen, quer zur Fasermembran laufende Einstülpungen

der Plasmamembran, die als transversales Tubulus-System oder T-System bezeichnet werden (Anderson-Cedergren, 1959). Das Innere der Tubuli steht mit dem Extrazellularraum in Verbindung (Porter und Palade, 1957; Huxley, 1964; Franzini-Armstrong, 1973). Die T-Tubuli anastomosieren untereinander, sind jedoch vom sarkoplasmatischen Retikulum durch einen etwa 12 nm breiten synaptischen Spalt getrennt (Franzini-Armstrong, 1971). Die Zone, in welcher jeweils zwei Terminalzisternen des sarkoplasmatischen Retikulums und ein T-Tubulus nebeneinander liegen, wird nach Porter und Palade (1957) als Triade bezeichnet.

Das T-System dient der schnellen Impulsübertragung von der äußeren Muskelfasermembran ins Innere. Die Triaden sind die Stelle der Impulsübertragung auf das sarkoplasmatische Retikulum.

2.1.2.6. Kontraktilles System

Die charakteristische Querstreifung der Muskelfaser, welche 1685 erstmals von Leeuwenhoek beschrieben wurde, ist durch die Myofibrillen bedingt. Die Myofibrillen haben einen Durchmesser von ungefähr 1 μm . Elektronenoptisch lassen sich regelmäßig angeordnete Sarkomere als Korrelat der lichtmikroskopischen Querstreifung darstellen. Als Sarkomer wird die Struktur zwischen je zwei elektronenoptisch dichten Z-Streifen verstanden. Unmittelbar neben dem Z-Streifen liegt das helle I-Band, darauf folgt das dunklere A-Band. Das A-Band wird durch die in der Mitte liegende M-Linie zweigeteilt, der unmittelbar der M-Linie

anliegende Teil des A-Bands ist etwas heller und wird H-Zone genannt.

Die Myofibrillen sind aus parallel angeordneten Aktin- und Myosinfilamenten, die in charakteristischer Weise ineinandergreifen, zusammengesetzt. Die Myosinfilamente, welche den dicken Filamenten des A-Bands entsprechen (Huxley und Hanson, 1954) sind ungefähr 15 nm breite und 1,6 μm lange hexagonal angeordnete Proteinstäbchen.

Aktinfilamente sind 1 μm lang und haben einen Durchmesser von 6 nm.

Die Myosinmoleküle setzen sich aus zwei Bestandteilen zusammen: aus dem stäbchenförmigen, aus einer Proteindoppelhelix bestehenden leichten Meromyosin (L-Meromyosin) mit einem Molekulargewicht von 120 000 Dalton (Weeds und Lowey, 1971), welches den Schwanzteil des Myosinmoleküls bildet und aus dem kugeligen schweren Meromyosin (H-Meromyosin) mit einem Molekulargewicht von 320 000 Dalton, das den Kopf bildet (Mannherz und Holmes, 1976). Das schwere Meromyosin besitzt enzymatische Eigenschaften: es spaltet ATP (Hasselbach, 1971).

Die Aktinfilamente durchziehen die I-Banden und inserieren an den Z-Streifen. Die Filamente bestehen aus einer Doppelhelix von F-Aktin.

Dieses ist ein Polymerisat von kugeligen Aktinmolekülen mit einem Molekulargewicht von 42 000 Dalton (Elzinga et al., 1973). Um die Aktindoppelhelix windet sich mit gleicher Periodik ein längliches filamentäres Molekül, das Tropomyosin. Diesem sind die aus drei Teilkomponenten bestehenden globulären Troponinmoleküle angelagert (Lehninger, 1978).

2.1.2.7. Nichtkontraktile Proteine

Das im Muskelgewebe vorhandene Myoglobin besteht aus einer einzelnen Peptidkette mit einem einzigen Häm als prosthetische Gruppe; sein Molekulargewicht beträgt 17 500 Dalton, der Anteil an Fe^{++} 0,338 %. Es wird in der Muskelzelle selbst synthetisiert (Adams et al., 1975) und dient vornehmlich der Energiespeicherung.

2.2. Lektine

Lektine sind Proteine oder Proteoglykane tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, welche mit hoher Affinität an Glykoproteine von Zellmembranen binden und zur Agglutination von Zellen führen können. Diese Fähigkeit beruht auf dem Vorhandensein von mindestens zwei Kohlehydratbindungsstellen pro Lektinmolekül (Gallagher, 1984). Die Einteilung der Lektine erfolgt einerseits nach ihrem Ursprung in solche pflanzlicher (wie zum Beispiel Weizenkelmagglutinin) oder tierischer Herkunft, andererseits nach der gebundenen Kohlehydrat- oder Proteoglykangruppe. Nach Gallagher werden dabei Lektine, deren agglutinierende Eigenschaften durch Monosaccharide in vitro gehemmt werden als Exolektine bezeichnet und von Endolektinen, welche durch Polysaccharide gehemmt werden, unterschieden. Allerdings scheint nicht nur die terminale Kohlehydratgruppe sondern auch die sterische Konfiguration, welche durch die übrigen Glykosidreste mitbedingt wird,

für die Oberflächenerkennung und die Adhäsivität der Lektine verantwortlich zu sein (Goldstein et al., 1975; Debray et al., 1981). Inzwischen wurde eine Vielzahl von Lektinen isoliert und bezüglich ihrer Bindungsfunktion charakterisiert. Übersichten hierzu finden sich bei Goldstein und Hayes (1978) und Dulanay (1979).

Die biologische Funktion der Lektine ist weitgehend unbekannt, sie scheinen jedoch eine Rolle in der Erkennung von Zelloberflächen zu spielen (Huges und Sharon, 1978; Köttgen et al., 1979; Barondes, 1981). In der experimentellen Forschung finden Lektine zur Charakterisierung von Membranoberflächen Anwendung. Dabei werden sie entweder mit fluoreszierenden Markern bzw. enzymatischen Markersystemen für die lichtmikroskopische Analyse oder aber mit elektronenoptisch dichten Partikeln für die elektronenmikroskopische Untersuchung konjugiert (Übersicht bei Ponder, 1983). In der myologischen Forschung der letzten Jahre wurde zum einen der Einfluß körpereigener Lektine auf die Muskelinnervation (Denbury, 1980) und auf die Myogenese in tierischen und menschlichen Muskeln untersucht (Nowak et al., 1977; Ceri et al., 1979; Ceri und Roberts, 1985). Dabei wird ein regulatorischer Einfluß von Lektinen auf die Fusion von Myofibrillen diskutiert. Zum anderen wird die Membranstruktur überwiegend menschlicher Muskelzellen unter Anwendung verschiedener Lektine untersucht (Bonilla et al., 1978; Pena et al., 1981; Paljarvi und Kariäläinen, 1984; Capaldi et al., 1984; Capaldi et al., 1985). Dabei zeigte sich, wie bereits oben erwähnt, daß neben der Saccharidengruppe vor allem die sterische Konfiguration der Membran und damit die Zugänglichkeit der Saccharidgruppen für die

Färbereaktion verantwortlich ist. So können Saccharide durch Proteoglykanseitenketten maskiert werden (Novadgradsky et al., 1975). Daneben spielt die Größe und Konfiguration des Lektin-Ligand-Komplexes eine Rolle für die Lektinbindung in histologischen Schnitten (Brigmann und Widnell, 1983). Die Anfärbung von Muskelkapillaren ist zudem beim menschlichen Muskel bei einigen Lektinen (BSA I-A4 und BSA I-B4) blutgruppenspezifisch (Capaldi et al., 1984). In einer Arbeit von Capaldi et al. (1985) konnte mit Hilfe der Lektine die Verteilung der Kollagenfasersubtypen im Muskel bestätigt werden, wie sie sich auch nach immunozytochemischen Studien darstellt: Im Perimysium finden sich vor allem Typ I- und Typ III-Kollagenfasern (Stephens et al., 1982), während sich die Typ IV- und Typ V-Kollagenfasern unmittelbar den Muskelfasern und Kapillaren aufgelagert finden. Die Basalmembran ist eine komplexe Struktur aus Typ IV- und V-Kollagen (Gulati et al., 1983), Fibronectin (Bertolotto et al., 1983) und Heparansulphat-proteoglycan (Gulati et al., 1983). Die Verteilung von Laminin entspricht der Verteilung der Typ IV-Kollagenfasern (Dunn et al., 1984).

2.3. Physiologische und biochemische Grundlagen der Muskelkontraktion

2.3.1. Energiebereitstellung

Die einzige Form chemischer Energie, die vom kontraktilen Parenchym unmittelbar in mechanische Arbeit umgewandelt werden kann, ist die Energie, die bei Hydrolyse der terminalen Phosphatgruppe des unten beschriebenen Adenosintriphosphats frei wird (Hasselbach, 1971). Die Nahrungsstoffe, aus deren Abbau die Energie für die Bildung der energiereichen Phosphate gewonnen wird, sind vor allem Kohlehydrate und Fette. Die energiebereitstellenden Reaktionen setzen schon während der energieverbrauchenden Kontraktion ein, überdauern sie aber beträchtlich. Die ATP-Restitution erfolgt je nach Bedarf und Zeitpunkt des Kontraktionszyklus mittels aerober und anaerober Glykolyse, Kreatinkinase-reaktion und Kreatinphosphokinase-reaktion (Lehninger, 1978).

2.3.1.1. Kohlehydrate

Das wichtigste Kohlehydrat der Muskulatur ist das Glykogen, ein ausschließlich aus Glukose aufgebautes Polysaccharid mit stark verzweigter Struktur und einem Molekulargewicht von 1 000 000 Dalton (Karlson, 1972), welches in Form von elektronenoptisch dichten Glykogengranula im Muskel vorliegt. Der normale Muskel enthält ungefähr 0,5 - 1,9 % Glykogen (Bonilla und Schottland, 1970). Daneben

kommen andere Kohlehydrate wie Glukose-6-Phosphat, Phosphoglycerat und Laktat in geringen Mengen vor.

2.3.1.2. Lipide

Im Muskel finden sich in großen Mengen Phospholipide, Cholesterin, freie Fettsäuren und Triglyceride. Im Säugermuskel machen die Lipide ungefähr 4 % des Frischgewichts aus (Hasselbach, 1977). Lipide stellen sowohl in Ruhe als auch bei längerer Belastung die Hauptenergiequelle der Muskulatur dar (Di Mauro et al., 1976).

2.3.1.3. Energiereiche Phosphate

Die rasche Energiebereitstellung während der Muskelkontraktion erfolgt über die energiereichen Phosphate Adenosintriphosphat (ATP) und Kreatinphosphat (KRP). ATP setzt unter hydrolytischer Spaltung in Adenosindiphosphat (ADP) Energie frei. Kreatinphosphat steht mit ATP im Gleichgewicht und stellt somit eine Energiereserve zur schnellen Regeneration von ATP dar (Hasselbach, 1977).

2.3.2. Physiologie der Muskelkontraktion

Die Kontraktion des Skelettmuskels kommt, wie die Arbeitsgruppen um Huxley und Niedergerke (1954) und Huxley (1957) nachgewiesen haben, durch Inneinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente zustande.

Entsprechend dieser Theorie der "gleitenden Filamente" findet während der Kontraktion eine Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin statt. Die sogenannten Myosinköpfe im Bereich des schweren Meromyosin, welche sowohl die enzymatischen Zentren für die Hydrolyse des ATPs als auch die Aktin-Bindungsstellen darstellen, bilden Querbrücken, die durch eine zyklisch ablaufende Knickbewegung die Aktinfilamente in die Sarkomermitte treiben (Mannherz und Holmes, 1976).

In Ruhe befinden sich die Querbrücken der Myosinköpfe in 90° Stellung. Sie haften nicht am Aktinfilament fest und haben ADP und PO_4 festgebunden. Auf einen nervalen Reiz strömt Ca^{++} in die Myofibrillen. Das Aktinfilament wird reaktionsbereit. Die Myosinquerbrücke heftet sich rasch an das Aktinfilament unter Ausbildung eines energiegeladenen Aktin-Myosin-Komplexes. Zur Erzeugung von Muskelkraft klappt die Querbrücke in die 45° Position. Hierdurch wird das Aktinfilament in Richtung Sarkomermitte getrieben, gleichzeitig wird das gebundene ADP und PO_4 freigesetzt. Durch Bindung eines neuen ATP-Moleküls wird die Aktin-Myosin-Querbrücke gelöst, der Myosinkopf schwingt in die 90° Ausgangsstellung unter Spaltung des gebundenen ATPs in ADP und PO_4 zurück.

2.4. Postmortale Veränderungen im Muskelgewebe

Der unmittelbar nach dem Schlachten nicht verkürzte, dehnbare Muskel erfährt unter verschiedenen Lagerungsbedingungen folgende Veränderungen:

zum einen Veränderungen der Dehnbarkeit mit Verlust der Elastizität, dem Rigor mortis entsprechend, zum anderen Verkürzungsvorgänge: zwischen 0 und +8 °Celsius findet die sogenannte Kälteverkürzung (Cold shortening), zwischen +50 und +100 °Celsius die Hitzeverkürzung und im Temperaturbereich zwischen +20 und +50 °Celsius die Rigorverkürzung statt (Locker und Daines, 1975).

2.4.1. Physiologie des Rigor mortis

Nach Ablauf des kontraktilen Zyklus ist wie oben erwähnt zur Lösung der Aktin-Myosin-Komplexe ATP nötig. Nach Sistieren der Blutzirkulation nach dem Tod unterbleibt die zur Energiebereitstellung nötige Zufuhr von Sauerstoff. Damit muß die Energie durch anaerobe Glykolyse unter Abbau von Glykogen und Anfall von Laktat mit konsekutivem Abfall des pH-Werts bereitgestellt werden. Die weiterhin im Rahmen des Erhaltungsstoffwechsels der Zelle ablaufenden energieverbrauchenden Prozesse führen zu einer Erschöpfung des ATP-Vorrats.

Mit Erschöpfung des ATP-Vorrats postmortal setzt eine Quervernetzung zwischen den dicken und dünnen Filamenten ein (Hamm et al., 1980). Dieser Verlust der passiven Dehnbarkeit des Muskel wird Rigor mortis genannt (Bendall, 1973). Die Scherkräfte innerhalb der Muskelfasern nehmen zu (Locker und Daines, 1975). Der Rigor mortis setzt je nach Tierart sowie nach Begleitumständen des Todes wie Transportzeiten, Behandlung durch die Treiber mit unterschiedlicher Latenz ein. Unter

den üblichen Kühlbedingungen ist dieser Vorgang bei Rindfleisch ungefähr nach 36 bis 40 Stunden beendet (Hecht, 1987). Das Intervall zwischen Tod und Eintritt des Rigor mortis zeigt eine parabelartige Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur mit einem Maximum bei einer Temperatur von +14 °Celsius (Hamm et al., 1984). Bei Temperaturen unter +12 °Celsius und über +20 °Celsius beginnt und endet der Rigor mortis früher als bei mittleren Temperaturen (Honikel und Hamm, 1983).

Nach Bate-Smith und Bendall (1956) hängt der Eintritt des Rigor mortis im wesentlichen von der Glykogenreserve des Muskels, dem pH-Wert bei Eintritt des Todes und der Umgebungstemperatur ab. Diese Parameter bestimmen den Zeitpunkt, an dem der pH-Wert des Gewebes und die intrazelluläre ATP-Konzentration beziehungsweise das Verhältnis Adenosintriphosphat/Inosinmonophosphat, der sogenannte R-Wert, einen für die Auslösung des Rigor mortis kritischen Wert unterschreiten. Im Rindermuskel setzt die Abnahme des ATPs bei Lagerung bei einer Temperatur von +20 °Celsius nach 9 Stunden ein (Jolley et al., 1980). Die kritische ATP-Konzentration, ab der der Rigor mortis beginnt, ist temperaturabhängig. Bei 14 °Celsius tritt der Rigor mortis bei ATP-Verarmung auf 25 % des Ausgangswerts ein, bei darüber und darunter liegenden Temperaturen hingegen schon bei geringerem ATP-Verlust (Honikel und Hamm, 1983). Die ATP-Verluste bei voller Ausbildung des Rigor mortis hingegen sind über den gesamten Temperaturbereich konstant (Honikel und Hamm, 1983).

Der kritische pH-Wert, ab dem der Rigor mortis eintritt, folgt einer ähnlichen Temperaturcharakteristik wie die ATP-Konzentration. Im Gegensatz hierzu ist allerdings die Verlaufskurve bei Eintritt des vollständigen Rigor mortis ebenfalls parabelartig geformt (Honikel und Hamm, 1983). Die Geschwindigkeit des pH-Abfalls hängt einerseits von der Tierspezies und dem untersuchten Muskel, andererseits von der Lagertemperatur ab.

Der R-Wert, das ist das Verhältnis ATP/IMP und somit ein Maß für den Verlust von ATP, nimmt mit zunehmender Glykogenolyse ab. Er steht allerdings mit dem pH-Wert nur teilweise in einer direkten proportionalen Beziehung. Diese ist in ihrem Verlauf temperaturabhängig (Honikel und Hamm, 1983).

2.4.2. Physiologie der postmortalen Muskelkontraktur

Das Ausmaß der Verkürzung der Sarkomeren wie auch des Muskels ist von der Gewebetemperatur abhängig, wobei zwischen Kältkontraktion (Cold shortening) bei Temperaturen unter +12 °Celsius und Rigorkontraktur bei Temperaturen über +20 °Celsius unterschieden werden muß. Die Kontraktionsvorgänge benötigen in hinreichendem Maße ATP und finden deshalb zeitlich vor Eintritt des Rigor mortis statt (Honikel und Hamm, 1983).

2.4.2.1. Kältekontraktion

Bei der Kältekontraktion handelt es sich um eine unmittelbar nach der Schlachtung ablaufende Kontraktion des Muskels, wenn die Temperatur des Fleisches rasch unter $+12^{\circ}\text{Celsius}$ gebracht wird (Locker und Haygard, 1963). Diese bleibt nach Eintritt der Totenstarre bestehen (Locker und Haygard, 1963; Bendall, 1973). Im Rindermuskel ist bereits 1 Stunde post mortem bei Temperaturen unter 6°Celsius eine deutliche Verkürzung zu erkennen, die beginnende Kältekontraktur anzeigt. Der Eintrittszeitpunkt der Kältekontraktur steht in direkt proportionalem Zusammenhang mit der Geschwindigkeit der Temperaturniedrigung. Bei höheren Temperaturen tritt diese erst später auf (Hamm et al., 1984). Zur Auslösung der Kältekontraktion ist wie bei der physiologischen Kontraktion im lebenden Organismus die Anwesenheit von Ca^{++} (Honikel und Hamm, 1978) und von ATP zur Energiebereitstellung nötig (Hamm, 1979). Bei Temperaturen unter $+5^{\circ}\text{Celsius}$ ist der ATP-abhängige Rücktransport von Ca^{++} aus dem Zellinneren in das sarkoplasmatische Retikulum wegen der Temperaturabhängigkeit der ATPase-Aktivität nicht mehr möglich (Lacourt und Carpenter, 1973). Bei Temperaturen zwischen $+15^{\circ}\text{Celsius}$ und 0°Celsius ist das sarkoplasmatische Retikulum außerdem nicht mehr in der Lage, Ca^{++} zu speichern (Pearson et al., 1977). Dies wird unter anderem auf Änderungen der physikalischen Eigenschaften der Phospholipidmembran, welche das sarkoplasmatische Retikulum bildet, zurückgeführt (Davey und Gilbert, 1974). Buege und Marsh (1975), Greaser (1977) und Hamm (1979)

hingegen gehen sowohl von einer anoxischen Schädigung der Muskelmitochondrien mit Ca^{++} -Freisetzung, als auch von einer verminderten Ca^{++} -Aufnahme durch das sarkoplasmatische Retikulum aus.

Da Typ-I-Fasern mehr Mitochondrien besitzen, aus welchen unter anaeroben Bedingungen Ca^{++} freigesetzt werden kann, neigen diese vermehrt zur Kältekontraktur (Buege und Marsh, 1975). Andererseits verfügt das sarkoplasmatische Retikulum von Typ-II-Fasern über eine bessere Fähigkeit zur Ca^{++} -Aufnahme (Bendall, 1978).

Mit der Kältekontraktion geht ein beschleunigter Abbau der Energiereserven einher; dies äußert sich in einem beschleunigten ATP-Abbau und Laktat-Anstieg (Honikel und Hamm, 1978).

2.4.2.2. Rigorverkürzung

Auch bei Temperaturen über $+20^{\circ}\text{C}$ kommt es, allerdings mit größerer zeitlicher Latenz als bei der Kältekontraktur (Hamm et al., 1984), zu einer Verkürzung der Sarkomerlänge und damit zu einer Muskelkontraktur (Honikel et al., 1981). Diese sogenannte Rigorverkürzung setzt ebenfalls eine ausreichende Menge ATP zur Energiebereitstellung voraus. Die Rigorverkürzung findet unmittelbar vor Eintritt des Rigor mortis statt, der pH-Wert liegt nach Messungen von Honikel et al. (1981) zu diesem Zeitpunkt bei 5,9, die ATP-Konzentration bei ungefähr $1,1 \mu\text{mol/g}$ (Honikel et al., 1981). Bei geringradigem weiteren Abfall des pH-Wertes auf 5,8 und der ATP-Konzentration unter $1,0 \mu\text{mol/g}$ erfolgt der Übergang in den Rigor mortis.

Diese Werte wurden von einer anderen Arbeitsgruppe (Currie und Wolfe, 1980) für mehrere verschiedene Muskeln bestätigt. Sie gelten allerdings nur unter der Voraussetzung eines normalen Glykogengehalts der Muskulatur zum Zeitpunkt der Schlachtung (Hamm et al., 1980).

Das Ausmaß der Rigorverkürzung nimmt mit der Temperatur zu (Honikel et al., 1981).

2.4.3. Lysis

Die mit Auftreten des Rigor mortis erfolgte Quervernetzung der Aktin- und Myosinfilamente ist irreversibel. Im Verlauf der Reifung des Fleisches kommt es allerdings zu Freisetzung proteolytischer Enzyme. Dies führt bezüglich der Rigidität der Muskulatur zu einem Zustand, der dem unmittelbar nach Schlachtung ähnlich ist. Die Geschwindigkeit, mit der diese Desintegration, die sogenannte Lysis, eintritt, steigt mit zunehmender Temperatur. Daneben ist sie, entsprechend den pH-Optima der proteolytischen Enzyme, abhängig vom pH-Wert (Marsh, 1983).

Erhitzen führt durch Denaturierung der Proteasen zu einem Abbruch der Lysis, Einfrieren durch Überführen des Lösungsmittels Wasser in den festen Aggregatzustand zu einer vorübergehenden Unterbrechung der Lysis.

Bisher wurden mehrere verschiedene Enzyme, welche Myofibrillen enzymatisch spalten, beschrieben: zum einen werden Kathepsine vor allem aus den Lysosomen freigesetzt (Penny, 1974). Daneben finden sich

Calcium-aktivierte Proteasen (Penny und Dransfield, 1979), alkalische Proteinasen und Serin-Proteinasen. Eine Übersicht hierüber findet sich bei Bechtel et al. (1983).

2.4.4. Morphologische Veränderungen bei Lagerung

Unter Lagerung über +15 °Celsius kommt es im Rahmen der Rigorkontraktur zu einer Verkürzung der Sarkomerlänge von bis zu 20 % (Ingram, 1973). Bei vorheriger Kühlung liegt diese Verkürzung deutlich über 20 % (Locker und Haygard, 1963), zum Teil liegt die Sarkomerlänge nach Kältekontraktur unter der Länge der Myosinfilamente (Stromer und Goll, 1967). Die Kontraktion der Myofibrillen innerhalb eines Muskels ist an verschiedenen Stellen unterschiedlich stark ausgeprägt (Katsaras et al., 1984). Im Stadium des vollausgebildeten Rigor mortis konnten an menschlicher Muskulatur feine Granula zwischen den Aktin- und Myosinfilamenten, welche den Querbrücken entsprechen, nachgewiesen werden (Suzuki, 1976).

Ab dem 9.Tag nach Schlachtung werden elektronenoptisch Querbrüche zwischen I-Banden und Z-Streifen beobachtet (Davey und Gilbert, 1967; Hay et al., 1973; Katsaras et al., 1984). Diese Veränderung nimmt mit zunehmender Lagerungsdauer zu, ist jedoch nicht regelhaft bei allen Proben erkennbar (Katsaras et al., 1984). Ab dem 6.Tag post mortem sind die Triaden nicht mehr nachweisbar. Es kommt zu einem teilweisen Verlust des sarkoplasmatischen Retikulums (Schaller und Powrie, 1971). Mit zunehmender Lagerungsdauer kommt es zum

Zerbrechen der Myofibrillen in kleine Bruchstücke, zur sogenannten Fragmentierung (Davey und Gilbert, 1969). Im Bereich der Basalmembran kommt es zu Zerreißen des Sarkolemm (Varriano-Marston et al., 1976).

2.5. Gefrierveränderungen

2.5.1. Allgemeine methodische Grundlagen

Fleisch wird gefroren, um seine Qualität über längere Zeit aufrechtzuhalten. Dadurch sollen biochemische und strukturelle Veränderungen sowie mikrobielles Wachstum in ihrem Zeitverlauf verzögert werden (Honikel, 1983). Gefrieren ist eine konservierende Maßnahme, die die chemische Zusammensetzung und Struktur des Fleisches nicht oder nur geringfügig verändert (Wirth, 1979).

Grundlage hierfür ist, daß sich unterhalb von $-12^{\circ}\text{Celsius}$ Fäulnis- und Verderbniserreger nicht mehr vermehren (Wirth, 1979). Bei Temperaturen unter $-20^{\circ}\text{Celsius}$ kommen enzymatische Vorgänge, welche zum einen zur Fleischreifung, zum anderen aber auch zur Qualitätsminderung beitragen können, weitgehend zum Erliegen. Ebenso findet unterhalb dieser Temperaturgrenze nur noch ein minimaler ATP-Verbrauch statt (Wirth, 1979).

Fleisch beginnt unterhalb von $-1,5^{\circ}\text{Celsius}$ zu gefrieren, bei einer Temperatur von $-65^{\circ}\text{Celsius}$ ist das gesamte gefrierbare Wasser

gefroren (Riedel, 1957). Der für kommerzielle Anwendungen günstigste Temperaturbereich liegt nach Wirth (1979) bei -20 bis -40 °Celsius.

2.5.2. Einfluß von Gefrier- und Auftauvorgängen auf den Wassergehalt von Muskelgewebe

Wesentlich für das Verständnis der beim Gefrieren ablaufenden Vorgänge ist die Tatsache, daß mehrzellige Organismen aus mehreren Kompartimenten, dem Extra- und dem Intrazellularraum aufgebaut sind, welche in unterschiedlicher Weise auf Absenkungen der Temperatur reagieren. Nach Hamm et al. (1982) kommt es bei langsamem Einfrieren zuerst zum Gefrieren von Wasser des Extrazellularraums (EZR). Mit der hierdurch bedingten Verminderung des Lösungsmittels Wasser im EZR kommt es zur Ausbildung eines osmotischen Gradienten vom Intrazellularraum (IZR) zum Extrazellularraum. Dies bedingt einen Wasserefflux aus der Zelle. Damit entstehen im EZR sehr große Eiskristalle. Wird hingegen sehr schnell abgekühlt, kommt es zu einer feinkristallinen, gleichmäßigen Eisbildung im IZR und EZR (Honikel et al., 1983).

Welche Folgen dieses unterschiedliche Gefrierverhalten nach sich zieht, wird in der Literatur kontrovers diskutiert: während Hamm et al. (1982) davon ausgehen, daß ein Teil des so in den EZR gelangten Wassers beim Auftauen nicht mehr rediffundieren kann und damit zum Austritt von freiem Fleischsaft führt, gehen andere Arbeiten (Anon und Calvelo, 1980; Quali et al., 1983; James et al., 1985) davon aus, daß dies keinen Einfluß auf den freien Fleischsaft habe.

Ebenso kontrovers wird das Auftreten von freiem Fleischsaft in Abhängigkeit von der Taugeschwindigkeit gesehen: die Arbeitsgruppe um Honikel (1983) fand ein vermindertes Wasserbindungsvermögen bei raschem Auftauen verglichen mit langsamerem Vorgehen. Zusätzlich kommt es nach Hamm et al. (1982) bei langsamem Auftauen zur Änderung der Kristallstrukturen mit Bildung großer Eiskristalle und konsekutiver Schädigung der Zellen. Hieraus resultiert ebenfalls vermehrter Fleischsaftverlust. James et al. (1985) fanden hingegen überdurchschnittlich viel Fleischsaftverlust sowohl bei sehr schnellem Auftauen mit Tauzeiten unter 5 Minuten als auch bei sehr prozessiertem Vorgehen mit Zeiten über 2000 Minuten.

2.5.3. Einfluß von Gefrier- und Auftauvorgängen auf das kontraktile System

Wird Fleisch nach Eintritt des Rigor mortis tiefgefroren, kommt es nach dem Auftauen zu keiner nennenswerten Veränderung des kontraktilen Systems (Honikel et al., 1983). Erfolgt der Gefriervorgang hingegen vor Eintritt des Rigor mortis, bestimmen Gefrier- und Taugeschwindigkeit und Lagerungsbedingungen den kontraktilen Zustand des Muskelparenchyms:

Erfolgt der Gefriervorgang sehr langsam, kommt es im Temperaturbereich unter 10 °Celsius zur oben erwähnten Kälteverkürzung. Wird der Muskel sehr schnell eingefroren, bei Temperaturen unter -20 °Celsius

gelagert und schnell aufgetaut, tritt wenige Minuten nach dem Auftauen eine circa 40 % Verkürzung des Muskels, die sogenannte Taukontraktur ein. Physiologisch handelt es sich wie bei der Kältekontraktur um die Freisetzung von Ca^{++} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum mit Ablauf einer Kontraktion unter der Voraussetzung noch ausreichender ATP-Vorräte. Wird das Fleisch hingegen bei Temperaturen von $-5\text{ }^{\circ}\text{Celsius}$ gelagert oder aber langsam bis zum Gefrierpunkt bei $-1,5\text{ }^{\circ}\text{Celsius}$ aufgetaut, kommt es zur Erschöpfung der intramuskulären ATP-Vorräte, die Taukontraktur kann damit nicht mehr eintreten.

2.5.4. Biochemische Veränderungen von Gefrierfleisch

Durch das Gefrieren von Fleisch kommt es zu einer teilweisen Schädigung der Mitochondrien mit Übertritt von mitochondrialen Enzymen in das Zytosol. Gottesmann und Hamm (1982) wiesen eine erhöhte β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität (HADH) im Fleischpreßsaft gefrorener Proben photometrisch nach. Während die Gesamtaktivität der Enzyme Lipoamiddehydrogenase, Citratsynthase und HADH nach Gefrieren weitgehend gleich bleibt, nimmt der Anteil der Enzymaktivitäten im Zytosol nach Gefrieren durch Lösung dieser Enzyme aus den Mitochondrien deutlich zu (Hamm, 1986). Durch längere Lagerung nimmt die Fragilität der Mitochondrien zu. Rasches Gefrieren führt nach Hamm (1986) bei Temperaturen unter $-10\text{ }^{\circ}\text{Celsius}$ zu einer deutlich stärkeren Schädigung der Mitochondrien als langsames. Längerdauernde Ge-

frierlagerung bei -20 °Celsius führt zu keiner Zunahme der mitochondrialen Enzyme Aconitase, Fumarase, Glutamatdehydrogenase, Malatdehydrogenase und Succinodehydrogenase im Preßsaft bei gleichzeitiger Abnahme der Gesamtaktivität (Hamm, 1984).

2.5.5. Morphologische Veränderungen

Die Bildung der Eiskristalle bei Gefrieren hängt nach lichtmikroskopischen Untersuchungen von Rahellic et al. (1985) an Rindermuskulatur in einer nicht linearen Beziehung von der Gefriertemperatur ab. Die stärksten Veränderungen mit intra- und extrazellulären Eiskristallen fanden sich bei -22 °Celsius. Elektronenmikroskopisch hingegen steht das Ausmaß der Eiskristallbildung in einer linearen Abhängigkeit zur Temperatur (Rahellic et al., 1985). Die frühesten Veränderungen finden sich im Bereich der I-Banden, wofür der genannte Autor die überwiegend hydrophobe Struktur dieses Bereichs mit geringer Wasserbindungskapazität verantwortlich macht. An Entenfleisch führt Gefrieren zu einer Erweiterung des sarkoplasmatischen Retikulums, zu Ablösungen und Verbreiterung des Sarkolemm und zum Untergang von Mitochondrien unter Hinterlassung optisch leerer Räume. Kernveränderungen wurden nicht beobachtet (Trziska et al., 1984).

An Rindfleisch führt rasches Gefrieren und Auftauen zu ausgeprägteren morphologischen Veränderungen als langsames Vorgehen (Meier, 1983).

Elektronenmikroskopisch lassen sich eine Deformierung der Mitochondrienmatrix, Brüche des T-Tubulussystems und eine Verdickung der Z-Linien nachweisen. Lichtmikroskopisch findet sich eine deutliche Zunahme des Fleischsafts (Lieblich und Kieslich, 1985).

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. Untersuchungsmaterial

Als Ausgangsmaterial für die strukturellen Untersuchungen wurde Fleisch von 8 Jungbullen der Rasse " Deutsches Höhenfleckvieh " verwendet. Nach routinemäßiger Schlachtung und Halbierung der Tierkörper wurden diese nach gesetzlicher Vorschrift einer 24-stündigen Vorkühlung (bei +4 °Celsius bis +7 °Celsius) unterzogen.

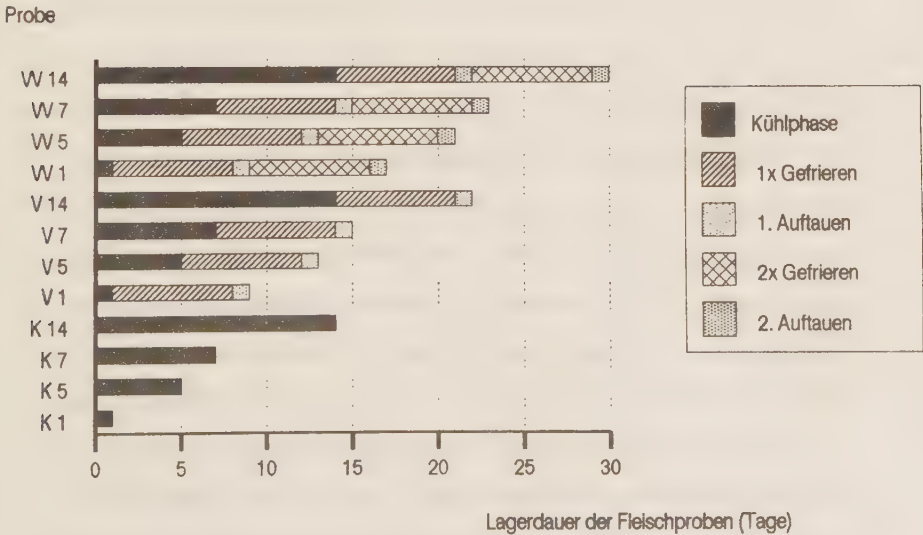
Die Entnahme der Fleischstücke erfolgte 24 Stunden nach der Schlachtung aus dem linken Vorderviertel im Bereich der Schultergürtelmuskulatur und aus der rechten Hinterbackenmuskulatur. Die zerlegten Fleischteilstücke wurden zur Reifung des Fleisches bei einer Temperatur von +4 °Celsius bis +7 °Celsius im Kühlraum gelagert. Aus diesen Stücken wurden jeweils am Tag 1 (entspricht 24 Stunden nach Schlachtung), 5, 7, 14 weitere Proben zur histologischen Weiterverarbeitung entnommen (Probenbezeichnungen K1, K5, K7, K14).

Sämtliche Fleischstücke wurden nach Entnahme der Frischfleischproben unter kommerziell üblichen Methoden gefroren und 1 Woche bei einer Temperatur von -18 °Celsius bis -20 °Celsius gelagert. Nach Auftauen der jeweiligen Fleischteilstücke bei +4 °Celsius bis +7 °Celsius über einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden wurden erneut Proben zur histologischen Weiterverarbeitung entnommen (Probenbezeichnung V1, V5, V7, V14).

Anschließend wurden die bei +4 °Celsius bis +7 °Celsius 24 Stunden zwischengelagerten Fleischteilstücke nochmals unter den oben genannten Bedingungen für 1 Woche eingefroren. Nach Auftauen erfolgte eine weitere Probenentnahme (Probenbezeichnung VV1, VV5, VV7, VV14).

Abbildung 3.1. gibt die Lagerdauer von Frischfleischproben (Kontrollgruppe K) und aufgetauten Gefrierfleischproben (Versuchsgruppe V = einmal gefroren, Versuchsgruppe VV = zweimal gefroren) sowie den jeweiligen Zeitpunkt der Probenentnahme für die histologische Untersuchung schematisch wieder.

Abb. 3.1. Probenentnahmeplan



3.2. Strukturelle Untersuchungsmethoden

3.2.1. Lichtmikroskopische Untersuchung

Die Gewebeproben zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurden aus zentralen Anteilen der Fleischteilstücke sorgfältig in Längsfaserrichtung präpariert. Die Gewebeprobengröße betrug ungefähr $1 \times 0,75 \times 0,75 \text{ cm}^3$. Die Fixierung der Proben erfolgte über 24 Stunden in Bouin'scher Lösung bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und routinemäßig in Paraplast eingebettet.

Von den Muskelproben wurden Längsschnitte mit einer Schichtdicke von $3 \mu\text{m}$ angefertigt. Diese wurden routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.), Goldner und Elsenhämatoxylin gefärbt und mit Eukitt eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte durch semiquantitative visuelle Analyse von jeweils 10 repräsentativen Gesichtsfeldern nach 3-teiligen einheitlichen Auswertungskriterien: Grad 0 entspricht fehlenden bis minimalen Veränderungen, Grad 1 leichten bis mäßigen Veränderungen und Grad 2 deutlichen Veränderungen. Anhand dieses einheitlichen, dreiteiligen Bewertungsmaßstabes wurden folgende strukturelle Kriterien subjektiv beurteilt: Faserverlauf, Faseranordnung, Faserzerreißung, Längsauffaserung, Veränderungen des Endomysiums, Bindegewebsveränderungen, Kernveränderungen, Fettgewebsveränderungen, Menge und Lokalisation des ausgetretenen freien Fleischsafts.

3.2.2. Probenpräparation für die Fluoreszenzmikroskopie

Die Gewebeproben zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden ebenfalls aus zentralen Anteilen der Fleischteilstücke sorgfältig in Längsfaserrichtung präpariert. Die Gewebeprobengröße betrug ungefähr 1 cm x 0,75 cm x 0,75 cm. Die Fixierung der Proben erfolgte über 24 Stunden in Bouin'scher Lösung bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und routinemäßig in Paraplast eingebettet.

Von den Muskelproben wurden Längsschnitte mit einer Schichtdicke von 5 µm angefertigt. Diese wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, zweimal jeweils 10 Minuten in einer PBS-Lösung (pH 6,8) gewaschen und anschließend getrocknet.

14 verschiedene, kommerziell erhältliche, an FITC gebundene Lektinlösungen wurden mit einem Phosphatpuffer 1:10 verdünnt und auf -20 °Celsius abgekühlt. Verwendet wurden 3 Lektine mit Spezifität für N-Acetylglukosamingruppen (GS2, UEA2, WGA), 9 Lektine mit Spezifität für N-Acetylgalaktosamingruppen (BPA, DBA, GS1, HPA, MPA, PNA, RCA1, RCA2, SBA) und je 1 Lektin mit Spezifität für Glukose/Mannose-Gruppen (Con A) und für L-Fucose-Gruppen (UEA2).

In einer feuchten Kammer wurden alle Schnitte mit Ausnahme einer Kontrollprobe mit 100 µl der Phosphatpuffer/Lektinmischung vollständig überdeckt und eine halbe Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal jeweils 10 Minuten

in PBS-Puffer gewaschen. Mit einem schwarzen Edding-Stift wurden die getrockneten Rückseiten der Objektträger gefärbt und bei -20 °Celsius im Dunkeln bis zur Beurteilung aufbewahrt.

Die Schnitte wurden mit einem DIALUX-Mikroskop (Leitz) mit Fluoreszenztubusaufsatz bei 100-facher Vergrößerung (Ölimmersion) ausgewertet.

Zur Auswertung der Präparate wurde eine einheitliche, dreiteilige Bewertungsskala verwendet: 0 entspricht keiner Fluoreszenz, 1 einer geringgradigen Fluoreszenz und 2 einer deutlichen Fluoreszenz.

3.2.3. Transmissionselektronenmikroskopie

Aus jeweils einem zentralen Abschnitt der verschiedenen Fleischproben (K, V und VV) wurden Gewebsstücke von ungefähr 1 mm x 1 mm x 1 mm Kantenlänge entnommen und sofort in 6 % Glutaraldehydlösung (0,15 M Natrium-Cacodylatpuffer) über einen Zeitraum von 3 Stunden bei 4 °Celsius fixiert.

Nach Weiterbehandlung der Proben in Waschlösung wurden sie für 3 Stunden in 1 % Osmiumtetroxydlösung bei +4 °Celsius kontrastiert. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Acetonreihe. Zur Einbettung wurde Araldit verwendet. Die Polymerisation erfolgte über 24 Stunden bei +35 °Celsius und weitere 48 Stunden bei +45 °Celsius. Zur Anfertigung der Ultradünnschnitte wurde ein LKB Ultratom Typ

4801 A verwendet. Die Schnitte wurden mit einem elektronisch gesteuerten Ultrastainer (Fa. LKB) mit 2 % Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds nachkontrastiert. Die Schnitte wurden mit einem Elmiskop 101 (Fa. Siemens) untersucht, auf Planfilm Agfa-Scientia fotografiert und anhand 6000-facher Vergrößerung ausgewertet. Der auf den elektronenmikroskopischen Bildern angebrachte Maßstab entspricht einer Länge von 1 μm .

Die Auswertung erfolgte durch Beurteilung von jeweils fünf elektronenmikroskopischen Abbildungen nach folgenden Kriterien: Faserverlauf, Faseranordnung, Längsauffaserung, Faserzerreißung, Abgrenzbarkeit der A- und I-Banden, Mitochondrienveränderungen, Kernveränderungen, Glykogenmenge und -verteilung.

Zur Analyse des Rigors, beziehungsweise der Lysis der Muskelfaserbündel, wurde die Länge der Sarkomeren, der A-Banden und der I-Banden von je 20 verschiedenen Sarkomeren der gleichen Probe morphometrisch bestimmt und der Mittelwert hieraus errechnet.

4. ERGEBNIS

4.1. Lichtmikroskopische Untersuchung

4.1.1. Strukturelle Veränderungen bei +4 °Celsius bis +7 °Celsius gelagerten Frischfleischproben aus Vorder- und Hintervierteln (K)

Einen Tag nach Schlachtung (K1) zeigt das histologische Schnittpräparat eines frischen Fleischstückes das charakteristische Erscheinungsbild des quergestreiften Muskelgewebes. Die Fasern sind in 7 Proben parallel und regelmäßig angeordnet; sie sind in ihrem Verlauf, soweit es die Schnittebene zuläßt, kontinuierlich verfolgbar (Abb. 4.1.). Bei einer Probe sind die Fasern leicht geschlängelt, der Faserverlauf ist hier an wenigen Stellen schräg zur Hauptfaserrichtung. Es finden sich weder Faserzerreißen noch Längsauffaserungen. Das Endomysium liegt den Muskelfasern dicht an. Das Bindegewebe und das univakuoläre Fettgewebe sind in ihrer Struktur erhalten. Nur gelegentlich verlieren die Fettzellen ihre runde bis ovale Form und wirken geringfügig deformiert. Die Kerne sind locker strukturiert und liegen unter dem Endomysium der Faser dicht an. In 7 von 8 Proben zeigt sich kein oder nur minimaler Austritt von freiem Fleischsaft, in 1 Probe findet sich wenig, im Bereich des Bindegewebes lokalisierter Fleischsaft.

Nach fünftägiger Lagerung (K5) liegen die Fasern bei 3 Proben parallel, bei 5 an wenigen Stellen schräg zum Faserverlauf. Die Fasern sind in 6 Proben leicht geschlängelt. 2 Proben zeigen leichte Faserzerreißen und Längsauffaserungen. Das Endomysium ist bei 2 Proben stellenweise von der Muskelfaser abgehoben. Leichte Bindegewebsveränderungen liegen in der Hälfte der Fleischstücke vor, in der anderen Hälfte ist das Bindegewebe unauffällig. Fettgewebsveränderungen bestehen nicht. Stellenweise verdichtet sich die Chromatinstruktur der Kerne. Ein Austritt von freiem Fleischsaft in die bindegewebigen Strukturen ist in minimaler Ausprägung bei 6, in geringem Umfang bei 2 Proben zu beobachten.

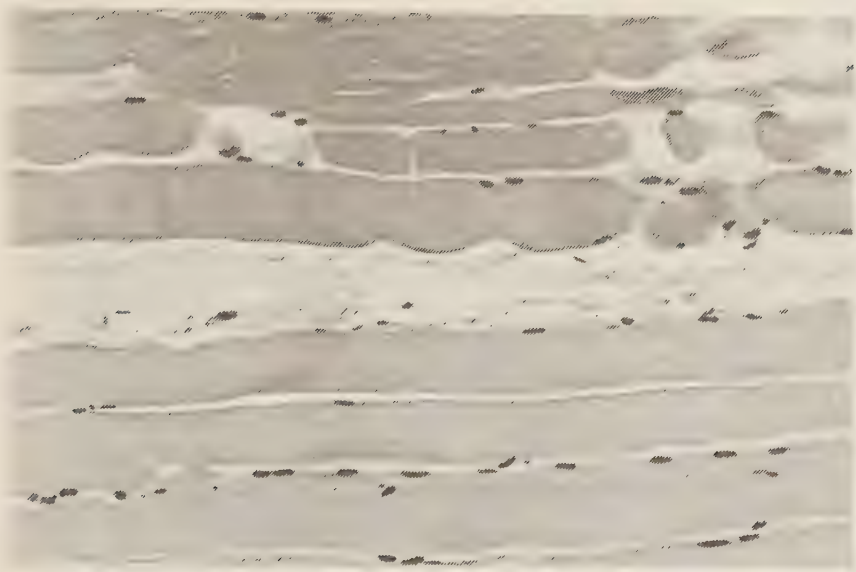


Abb. 4.1. Frischfleischprobe (K1): weitgehend paralleler Faserverlauf, keine Endomysiumsablösungen, (H.E., x 100)

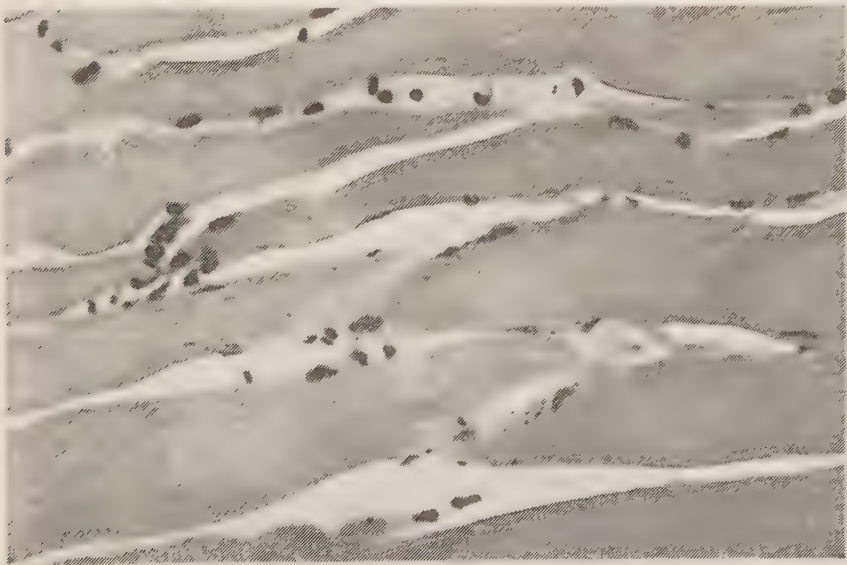


Abb. 4.2. Frischfleischprobe (K7): leichte Schlängelung, geringe Endomysiumsablösungen, leicht erweiterte Faserabstände, (H.E., x 400)

Sechs der sieben Tage gelagerten Proben (K7) sind mäßig geschlängelt und zeigen mehrere zusammenhängende Areale mit unregelmäßiger Faseranordnung, die übrigen 2 Proben sind minimal geschlängelt und weitgehend parallel (Abb. 4.2.). Mäßiggradige Faserzerreißen und Längsauffaserungen bestehen bei 5, minimale bei 3 Proben. Leichte Ablösungen des Endomysiums liegen bei 7 Proben, keine bei 1 Probe vor. Nur minimale Bindegewebsveränderungen finden sich bei 2 Proben, mäßige bei 6. Das Fettgewebe ist in 4 Fällen im wesentlichen unverändert, in 4 Fällen leicht verändert mit Deformierung der Zellen und Zerreißen nebeneinanderliegender Zellen. Freier Fleischsaft liegt in mäßiger Ausprägung bei 5 Proben im Bindegewebe vor.

Nach vierzehntägiger Lagerung (K14) ist der Faserverlauf bei 1 Probe nur gering verändert, 6 Proben zeigen zusammenhängende Areale mit unregelmäßiger Faseranordnung und eine mäßige Schlängelung der Fasern (Abb. 4.3.). Bei einer Probe sind die Fasern deutlich geschlängelt und in großen Gewebspartien ist kein paralleler Faserverlauf mehr vorhanden. Die Faserzerreißen ist bei 3 Proben minimal, bei 3 mäßiggradig und bei 2 deutlich ausgeprägt. Längsauffaserungen finden sich in Teilen von Einzelfasern bei 2 Proben, im Gesamtverlauf von Einzelfasern bei 6 Proben. Mehrere Fasern mit Ablösungen des Endomysiums finden sich bei allen untersuchten Proben. Das Bindegewebe ist bei 7 Proben an mehreren Stellen mäßig zerrissen, bei einer Probe minimal. Nur einzelne Fettzellzerreißen bestehen bei 5 Proben, Zerreißen von mehreren nebeneinanderliegenden Fettzellen bei 3. Bei 2 Proben ist in minimalem Maß Fleischsaft in das Bindegewebe ausgetreten, bei 5 Proben wenig und bei 1 Probe mäßiggradig.

4.1.2. Strukturelle Veränderungen bei einmal gefrorenen Fleischproben (-18 °Celsius bis -20 °Celsius) aus Vorder- und Hintervierteln (V)

Nach einem Tag Lagerung im Kühlhaus und siebentägigem Tiefgefrieren (V1) sind 7 von 8 Proben mäßig geschlängelt und zeigen mehrere zusammenhängende Areale mit unregelmäßiger Faseranordnung, die übrige Probe ist nur minimal geschlängelt und weitgehend parallel.

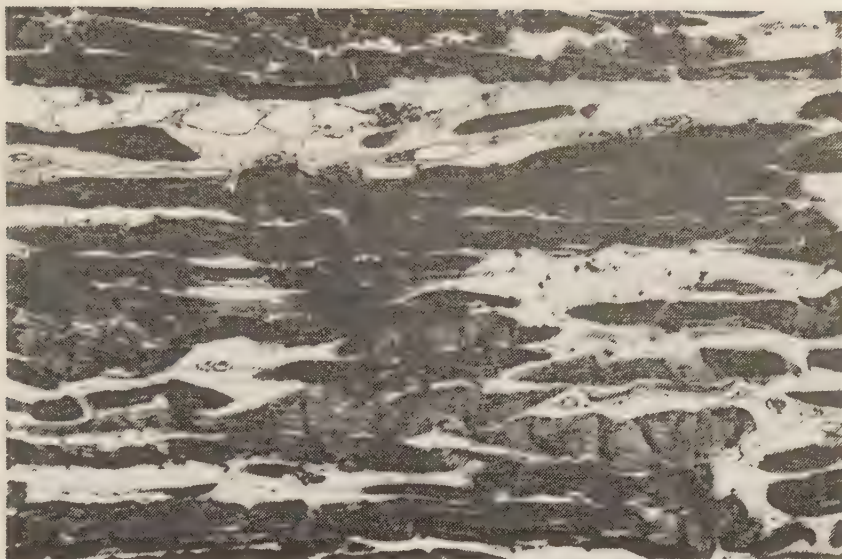


Abb. 4.3. Frischfleisch (K14): deutliche Schängelung der Fasern, einzelne Faserzerreißungen, (Goldner, $\times 100$)

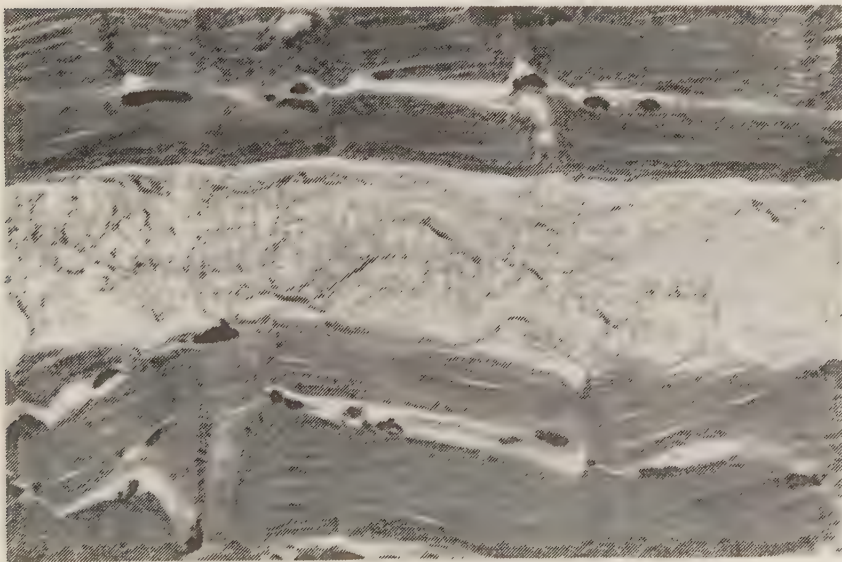


Abb. 4.4. Gefrierfleisch (V1): Fleischsaftaustritt, Endomyslumsablösung, Längsauffaserung der Fasern, (H.E., $\times 400$)

Mäßiggradige Faserzerreißen und Längsauffaserungen bestehen bei 6, minimale bei 2 Proben. Ablösungen des Endomysiums bei mehreren Fasern liegen bei allen 8 Proben vor. Mäßige Bindegewebsveränderungen finden sich bei allen Proben. Das Fettgewebe ist in 5 Fällen im wesentlichen unverändert, in 3 Fällen leicht verändert mit Deformierung der Zellen und Zerreißen nebeneinander liegender Zellen. Freier Fleischsaft liegt bei 4 Proben in mäßiger Ausprägung vor. Bei den anderen 4 Proben zeigt sich ein deutlicher Fleischsaftaustritt (Abb. 4.4.). Bei allen 8 Proben kommt der Fleischsaft im Bindegewebe, zwischen den Faserzerreißen und zwischen abgelösten Membranen zu liegen.

Nach fünftägiger Lagerung und einwöchigem Gefrieren (V5) zeigen 6 Proben zusammenhängende Areale mit unregelmäßiger Fasernordnung und eine mäßige Schlängelung der Fasern; bei 2 Proben sind die Fasern deutlich geschlängelt und in großen Gewebspartien ist kein paralleler Faserverlauf mehr vorhanden. Die Faserzerreißen sind bei 6 mäßiggradig und bei 2 deutlich ausgeprägt. Längsauffaserungen finden sich im Gesamtverlauf von Einzelfasern bei 6 Proben, in deutlichem Ausmaß in zahlreichen nebeneinanderliegenden Fasern bei 2 Proben. Mehrere Fasern mit mäßigen Ablösungen des Endomysiums finden sich bei 4 untersuchten Proben; deutliche Ablösungen des Endomysiums in jedem Gesichtsfeld bei den anderen. Das Bindegewebe ist bei 4 Proben an mehreren Stellen mäßig, bei 4 deutlich zerrissen. Nur einzelne Fettzellzerreißen bestehen bei 6 Proben, Zerreißen von mehreren nebeneinander liegenden Fettzellen bei 2. Bei 7 Proben ist in deutlichem Umfang Fleischsaft ausgetreten (Abb. 4.5.), bei 1 Probe nur wenig. Der freie Fleischsaft ist an Zerreißenstellen, unter Membranablösungen und im Bindegewebe lokalisiert.

Nach siebentägiger Lagerung und einwöchigem Gefrieren (V7) liegen die Fasern bei 3 Proben in zusammenhängenden Arealen unregelmäßig angeordnet, bei 5 Proben liegt in großen Gewebspartien kein paralleler Faserverlauf mehr vor. Die Fasern sind in 1 Probe leicht, in 4 mäßig und in 3 deutlich geschlängelt. 2 Proben zeigen mäßige Faserzerreißen und Längsauffaserungen, 6 deutliche. Das Endomysium ist bei

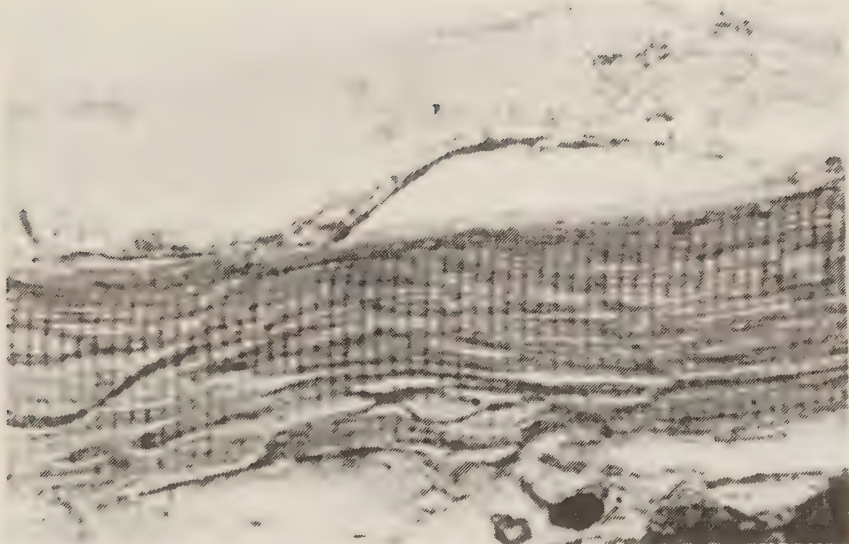


Abb. 4.5. Gefrierfleisch (V5): Austritt von freiem Fleischsaft, Ablösungen des Endomysiums, (H.E., x 400)

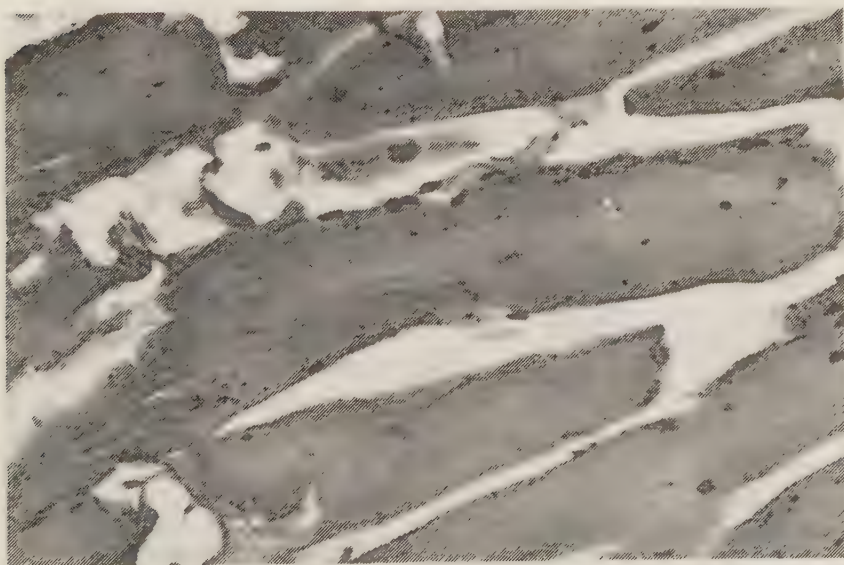


Abb. 4.6. Gefrierfleisch (V14): starke Faserzerreißen, Endomysiumsablösungen, (H.E., x 400)

5 Proben in mehreren Fasern von der Muskelfaser abgehoben, in 3 bei fast allen Fasern. Mäßige Bindegewebsveränderungen, das bedeutet Zerreißen an mehreren getrennten Stellen liegen in 6 Proben vor, in 2 Proben sind große zusammenhängende Bindegewebsareale zerrissen. Fettgewebsveränderungen bestehen bei 2 Proben in minimaler Ausprägung, bei 6 in mäßiger. Ein Austritt von freiem Fleischsaft in das Bindegewebe, an Zerreißungsstellen und unter Membranablösungen ist in mäßiger Ausprägung bei 2, in deutlichem Umfang bei 6 Proben zu beobachten.

Nach vierzehntägiger Lagerung und siebentägigem Gefrieren (V14) ist der Faserverlauf bei 2 Proben in zusammenhängenden Arealen unregelmäßig, entsprechend einer mäßiggradigen Veränderung, 6 Proben zeigen in großen Gewebspartien keinen parallelen Faserverlauf mehr, entsprechend deutlichen Veränderungen. Bei 5 findet sich eine mäßige Schlängelung der Fasern; bei 3 Proben sind die Fasern deutlich geschlängelt. Die Faserzerreißen sind bei 1 minimal und bei 7 deutlich ausgeprägt (Abb. 4.6.). Längsauffaserungen finden sich in Teilen von Einzelfasern, entsprechend leichten Veränderungen bei 1 Probe, im Gesamtverlauf von Einzelfasern, entsprechend mäßigen Veränderungen bei 7 Proben. Mehrere Fasern mit Ablösungen des Endomysiums finden sich bei 2 untersuchten Proben, bei 6 Proben zeigen fast alle Fasern Ablösungen (Abb. 4.7.). Das Bindegewebe ist bei 1 Probe an mehreren Stellen mäßig zerrissen, bei 7 deutlich. Nur einzelne Fettzellzerreißen bestehen bei 2 Proben, Zerreißen von mehreren nebeneinanderliegenden Fettzellen bei 6. Bei 2 Proben ist wenig Fleischsaft ausgetreten, bei 6 viel. Dieser ist im Bereich der Faserzerreißen, der Endomysiumsablösungen und des Bindegewebes lokalisiert.

4.1.3. Strukturelle Veränderungen bei zweimal gefrorenen Fleischproben (-18 °Celsius bis -20 °Celsius) aus Vorder- und Hintervierteln (VV)

Nach eintägiger Lagerung und zweimaligem, je einwöchigen Gefrieren (VV1) zeigen 5 Proben zusammenhängende Areale mit unregelmäßiger Faseranordnung und eine mäßige Schlängelung der Fasern; bei 3 Proben



Abb. 4.7. Gefrierfleisch (V14): Ablösung des Perimysiums von den Muskelfaserbündeln, (H.E., x 400)

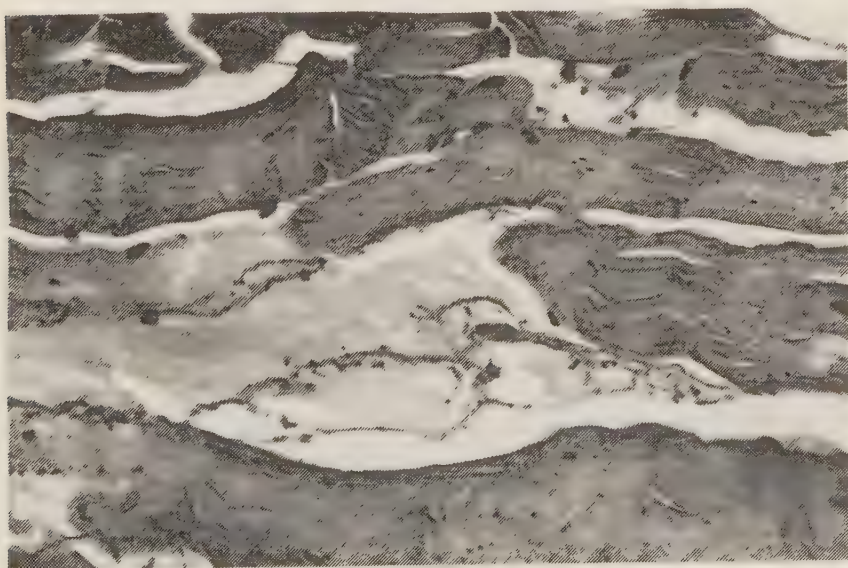


Abb. 4.8. Gefrierfleisch (VV1): Austritt von freiem Fleischsaft zwischen die Muskelfasern, (H.E., x 400)

sind die Fasern deutlich geschlängelt, in großen Gewebspartien ist kein paralleler Faserverlauf mehr vorhanden. Die Faserzerreißen sind bei 3 Proben mäßiggradig und bei 5 deutlich ausgeprägt.

Längsauffaserungen finden sich im Gesamtverlauf von Einzelfasern, entsprechend mäßigen Veränderungen bei 4 Proben, in deutlichem Ausmaß in zahlreichen nebeneinanderliegenden Fasern bei weiteren 4 Proben. Mehrere Fasern mit Ablösungen des Endomysiums finden sich bei der Hälfte der untersuchten Proben, Ablösungen des Endomysiums in jedem Gesichtsfeld bei der anderen Hälfte. Das Bindegewebe ist bei 5 Proben an mehreren Stellen mäßig, bei 3 deutlich zerrissen. Zerreißen von mehreren nebeneinanderliegenden Fettzellen bestehen bei allen Präparaten. Bei 7 Proben ist viel Fleischsaft ausgetreten, bei 1 wenig. Der freie Fleischsaft ist an Zerreißenstellen, unter Membranablösungen und im Bindegewebe lokalisiert (Abb. 4.8.).

Fünf der 5 Tage im Kühlhaus gelagerten und zweimal tiefgefrorenen Proben (VV5) sind mäßig geschlängelt und zeigen mehrere zusammenhängende Areale mit unregelmäßiger Faseranordnung, drei Proben sind deutlich geschlängelt und zeigen eine sehr unregelmäßige Faseranordnung. Mäßiggradige Faserzerreißen und Längsauffaserungen bestehen bei 2, deutliche bei 6 Proben. Ablösungen des Endomysiums bei zahlreichen Fasern, entsprechend deutlichen Veränderungen, liegen bei allen 8 Proben vor. Bei allen untersuchten Proben finden sich deutliche Bindegewebsveränderungen in Form von Zerreißen. Das Fettgewebe ist in 8 Fällen mäßig verändert mit Deformierung der Zellen und Zerreißen nebeneinanderliegender Zellen. Freier Fleischsaft liegt in massivem Ausmaß in allen Proben im Bindegewebe, zwischen den Faserzerreißen und zwischen abgelösten Membranen vor.

Nach siebentägiger Lagerung und zweimaligem Gefrieren (VV7) ist der Faserverlauf bei 1 Probe in zusammenhängenden Arealen unregelmäßig, entsprechend einer mäßiggradigen Veränderung; 7 Proben zeigen in großen Gewebspartien keinen parallelen Faserverlauf mehr. Bei 8 Proben sind die Fasern deutlich geschlängelt. Die Faserzerreißen sind bei 8 deutlich ausgeprägt. Längsauffaserungen finden sich in Teilen

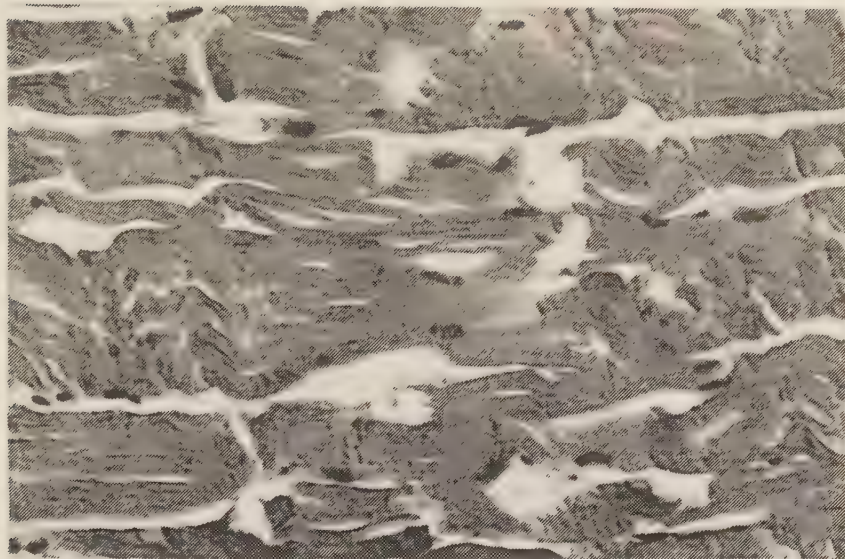


Abb. 4.9. Gefrierfleisch (VV14): Längsauffaserung mit Vergrößerung des Myofibrillenmusters, Querzerreißen, (H.E., x 400)

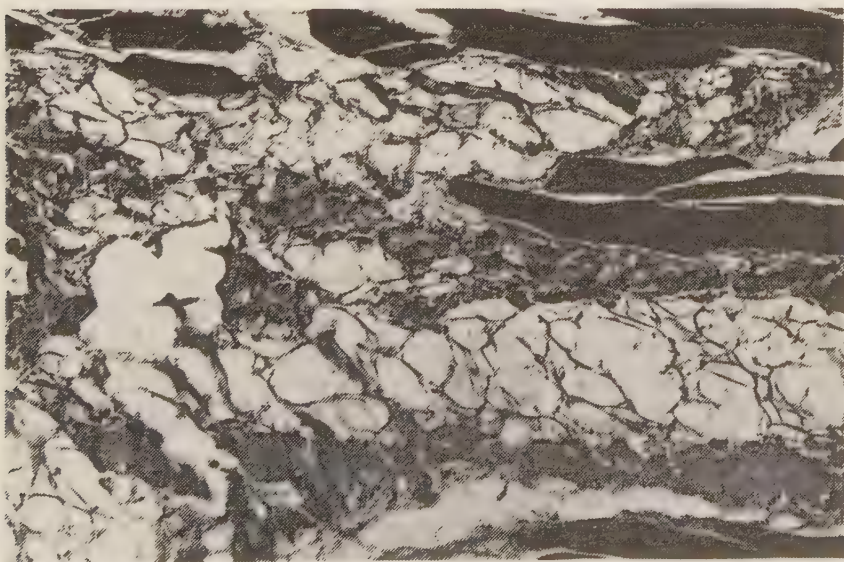


Abb. 4.10. Gefrierfleisch (VV14): Entrundung und Zerreißen der Fettgewebszellen, Austritt von freiem Fleischsaft, (H.E., x 100)

von Einzelfasern, entsprechend leichten Veränderungen bei 1 Probe, im Gesamtverlauf von Einzelfasern, entsprechend mäßigen Veränderungen bei 3, in deutlicher Ausprägung bei 4. Bei 8 Proben zeigen fast alle Fasern Ablösungen des Endomysiums. Das Bindegewebe ist bei 1 Probe an mehreren Stellen mäßig zerrissen, bei 7 deutlich. Nur einzelne Fettzellzerreißen bestehen bei 2 Proben, Zerreißen von mehreren nebeneinanderliegenden Fettzellen bei 5, deutliche Zerreißen des Fettgewebes bei 1 Probe. Bei allen Proben ist viel Fleischsaft ausgetreten. Dieser ist im Bereich der Faserzerreißen, der Endomysiumablösungen und des Bindegewebes lokalisiert.

Nach vierzehntägiger Lagerung und zweimaligem Gefrieren (VV14) verlaufen die Fasern nur noch über kurze Strecken. Ihre parallele Anordnung ist völlig aufgehoben, sie sind mehrfach in ihrem Verlauf deutlich zerrissen (Abb. 4.9.). In allen 8 Proben ist eine deutliche Längsauffaserung nachweisbar. Das Endomysium hat sich in allen Proben deutlich abgelöst und liegt regellos im Interzellularraum. Das Bindegewebe zeigt in großen Verbänden deutliche Zerreißen. Das Fettgewebe ist in 5 Präparaten mäßig zerrissen, in 3 deutlich (Abb. 4.10.). Zwischen all diese Bruchstücke des ursprünglichen Gewebes, in präformierte wie in entstandene Räume, tritt bei allen Proben eine große Menge freien Fleischsafts aus.

4.1.4. Vergleichende Darstellung der strukturellen Veränderungen von Frischfleisch und Gefrierfleisch in Abhängigkeit von der Lagerdauer

4.1.4.1. Spezielle Veränderungen des Muskelgewebes

4.1.4.1.1. Veränderungen des Faserverlaufs und der Faseranordnung

Am ersten Tag nach der Schlachtung (K1) finden sich keine Gewebszerreißen, die Fasern liegen parallel. Sie sind nur wenig geschlängelt und liegen meist dicht aneinander. Allerdings treten bei 2 Frischfleischproben größere optisch leere Räume zwischen den Muskelfasern bereits nach dem ersten Tag auf.

Der am ersten Tag nach Schlachtung (K1) parallele Faserverlauf erfährt mit zunehmender Lagerungsdauer (K5 - K14) und mehrmaligem Auftauen (V,VV) eine zunehmende Desintegration: es finden sich ausgedehnte Gewebsanteile mit regelloser Faseranordnung. Die Regelmäßigkeit der Faseranordnung unterscheidet sich in allen Fällen bezüglich ihrer Ausprägung zwischen den Proben K1 und K5 und den Proben, die ein- oder zweimal tiefgefroren wurden. Eine sichere Unterscheidung zwischen länger im Kühlhaus gelagerten Proben und eingefrorenem Fleisch ist jedoch allein aufgrund der Veränderungen des Faserverlaufs und der Faseranordnung nicht in allen Fällen möglich. Ebenso läßt sich einmal gefrorenes Fleisch nicht von zweimal gefrorenem allein auf Grund dieses Kriteriums unterscheiden.

Schlängelungen der einzelnen Fasern sind nach fünftägiger Lagerung in mäßiger Ausprägung in den meisten Proben nachweisbar. Gleichartig ausgeprägte Schlängelungen finden sich auch in der Mehrzahl der gelagerten und eine Woche gefrorenen Proben, sowie bei den ein und fünf Tage gelagerten und zweimal je eine Woche tiefgefrorenen Proben. Die sieben und vierzehn Tage im Kühlhaus gelagerten und je zweimal eine Woche gefrorenen Proben zeigen hingegen überwiegend deutliche Schlängelungen.

4.1.4.1.2. Faserzerreißen

Die Mittelwerte der Faserzerreißen unterscheiden sich zwischen nichtgefrorenen, einmal und zweimal gefrorenen Proben zum jeweils gleichen Zeitpunkt nach Schlachtung (Abb. 4.11.). 7 Tage eingefrorenes (V7) und 7 Tage abgelagertes Fleisch (K7) läßt sich bezüglich der Ausprägung der Faserzerreißen nicht unterscheiden.

Gegenüber dem Zustand einen Tag nach Schlachtung (K1) kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Faserzerreißen sowohl in der Gruppe mit einmaligem, wie in der mit zweimaligem Gefrieren.

Betrachtet man den individuellen Verlauf der Faserzerreißen, so nimmt mit zunehmender Lagerungsdauer und vor allem auch mit Zahl der Auftau- und Gefriervorgänge die Anzahl der Einzelfasern mit

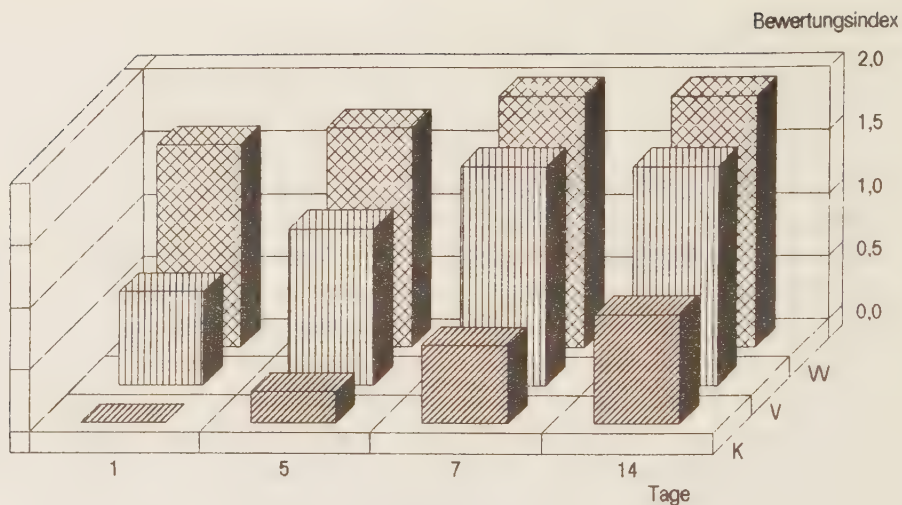


Abb. 4.11.: Zunahme der Faserzerreiungen (Mittelwerte der BewertungsindeX) nach unterschiedlicher Lagerdauer und Vorbehandlung (K = Frischfleisch, V = einmal gefroren, VV = zweimal gefroren)

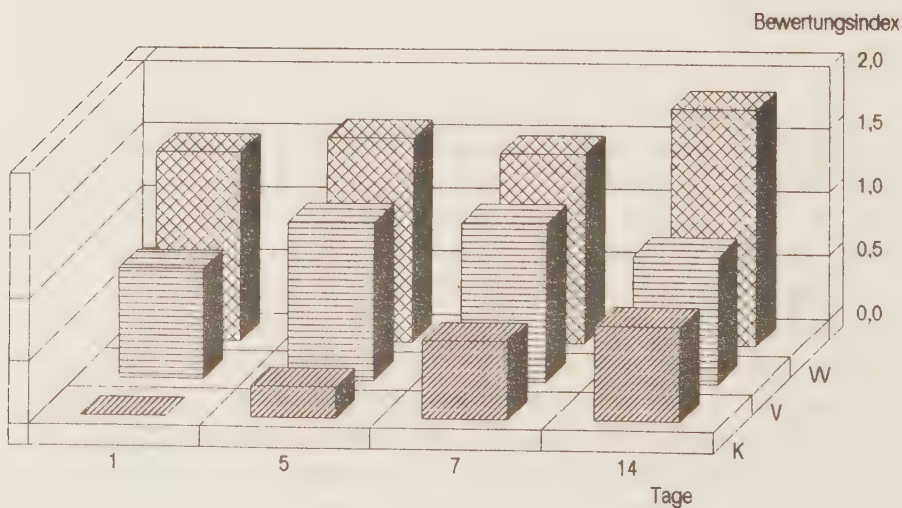


Abb. 4.12.: Zunahme der Längsauffaserung (Mittelwerte der BewertungsindeX) nach unterschiedlicher Lagerdauer und Vorbehandlung (K = Frischfleisch, V = einmal gefroren, VV = zweimal gefroren)

Faserzerreiungen und die Anzahl der Faserzerreiungen pro Einzelfaser zu.

Die Faserzerreiungen weisen allerdings eine große interindividuelle Streuung ab siebentägiger Lagerung bei +4 ° Celsius (K7) auf, so daß ab diesem Zeitpunkt, unter der Prmissa der Unkenntnis des individuellen Ausgangsbefunds, keine sichere Unterscheidung aufgrund dieses Kriteriums allein von allen anderen Bearbeitungszustnden mehr möglich ist.

4.1.4.1.3. Längsauffaserung

Die Längsauffaserung der einzelnen Myofibrillen, verstanden als Anteil der Muskelfasern mit Auseinanderdrängen der einzelnen Myofibrillen und damit einer Vergroerung des Fibrillenmusters, nimmt sowohl mit der Anzahl der Auftau- und Gefrierprozee als auch mit der Dauer nach Schlachtung deutlich zu (Abb. 4.12.).

Die semiquantitativ ermittelten Schweregrade von einen Tag gelagerten Frischfleischproben (K1) unterscheiden sich im Mittel um 1 Stufe von allen einmal (V1 - V14), um 2 Stufen von allen zweimal gefrorenen und wiederaufgetauten Proben (VV1 - VV14). Die ein- und zweimal gefrorenen Proben unterscheiden sich untereinander nicht wesentlich.

4.1.4.1.4. Ablösungen des Endomysiums

Unmittelbar nach Schlachtung finden sich nur an einigen wenigen Fasern in umschriebenen Faserabschnitten Ablösungen des Endomysiums. Bei längerer Lagerung nehmen diese Ablösungen deutlich bezüglich der Anzahl der betroffenen Fasern und der betroffenen Faserabschnitte zu (Abb. 4.13.). Gefrieren führt zu einer weiteren qualitativen und quantitativen Zunahme dieser Veränderungen. Einen Tag gelagertes Frischfleisch (K1) läßt sich in allen Fällen von ein- oder zweimal gefrorenem Fleisch unterscheiden (V, VV). Die im Kühlhaus bei einer Temperatur von +4 °Celsius bis +7 °Celsius bis zu sieben Tage gelagerten Proben (K1, K5, K7) lassen sich von den mindestens fünf Tage gelagerten und

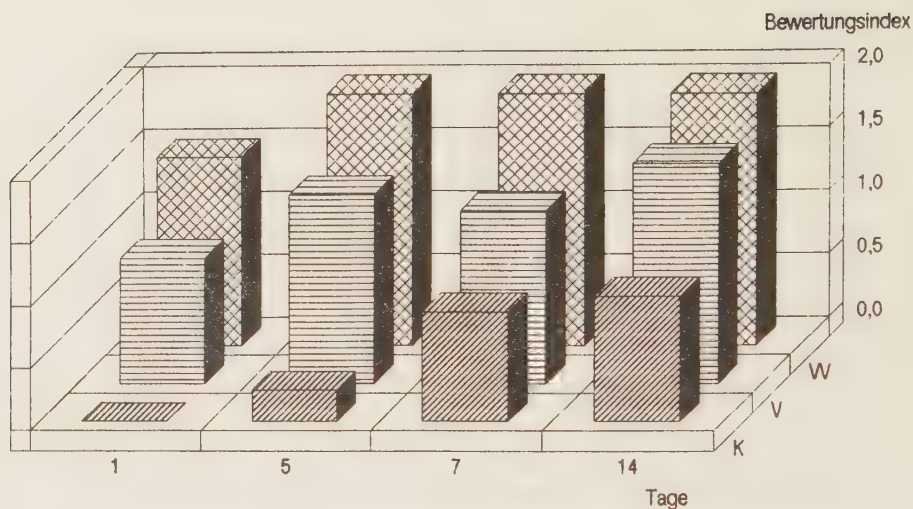


Abb. 4.13.: Zunahme der Ablösungen des Endomysiums (Mittelwerte der Bewertungsindices) nach unterschiedlicher Lagerdauer und Vorbehandlung (K = Frischfleisch, V = einmal gefroren, VV = zweimal gefroren)

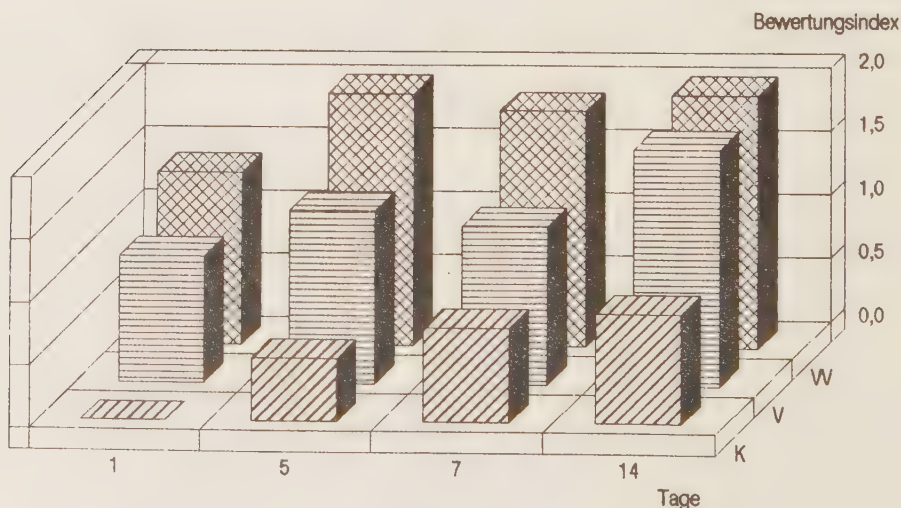


Abb. 4.14.: Zunahme der Zerreißen des Bindegewebes (Mittelwerte der Bewertungsindices) nach unterschiedlicher Lagerdauer und Vorbehandlung (K = Frischfleisch, V = einmal gefroren, VV = zweimal gefroren)

zweimal tiefgefrorenen Proben (VV5, VV7, VV14) unterscheiden. Eine Unterscheidung der übrigen Gruppen untereinander bezüglich der Veränderungen des Endomysiums ist nicht sicher möglich.

4.1.4.1.5. Kernveränderungen

In allen untersuchten Muskelproben liegen die Kerne überwiegend subsarkolemmal. Bereits am ersten Tag nach Schlachtung finden sich in einigen Proben Kerne mit verdichtetem Chromatin neben normalen Zellkernen. Daneben finden sich bereits zu diesem Zeitpunkt einige deutlich ballonierte Kerne. Die Anzahl der Kernveränderungen nimmt mit der Lagerungsdauer zwar zu, die interindividuellen Unterschiede übertreffen allerdings die intraindividuellen. Sie lassen sich damit auf lichtmikroskopischer Ebene nicht mit der Dauer der Lagerung oder mit der Anzahl der Gefrier- und Auftauvorgänge in Beziehung setzen.

4.1.4.2. Veränderungen des Interstitiums

4.1.4.2.1. Veränderungen des Bindegewebes

Der Grad der Bindegewebserweiterungen und Zerreißen nimmt einerseits als Funktion der Zeit nach Schlachtung, andererseits in Zusammenhang mit Gefrier- und Auftauvorgängen zu (Abb. 4.14.). Bei der semiquantitativen visuellen Analyse unterscheiden sich im Mittel der untersuchten Proben die Frischfleischproben K1 von den Gefrierfleischproben VV1 und die Frischfleischproben K14 von VV14 um einen Schweregrad. Eine Unterscheidung in allen Fällen ist zwischen Frischfleischproben (K1) und allen ein- oder zweimal gefrorenen Proben, sowie zwischen den ein bis vierzehn Tage gelagerten Proben (K1, K5, K7, K14) und den vierzehn Tage gelagerten und je zweimal gefrorenen Proben (VV14) möglich. Die einmal gefrorenen Proben (V) unterscheiden sich nicht wesentlich von den zweimal gefrorenen (VV).

4.1.4.2.2. Veränderungen des Fettgewebes

Im Bereich des perimysialen Fettgewebes kommt es ebenso abhängig von der Lagerungsdauer zur Zunahme von Zerreißen einzelner Fettzellen (Abb. 4.15.). Die Lokalisation des Fettgewebes innerhalb der entnommenen Muskelprobe beeinflusst diese Zerreißen nicht, allerdings scheinen größere Fettgewebsverbände eher zu diesen zu prädisponieren als kleine Anhäufungen von Fettzellen.

Betrachtet man wiederum den individuellen Verlauf der Fettgewebszerreißen im Sinne einer Längsschnittuntersuchung der verschiedenen Proben jeweils des gleichen Fleischteilstückes, so läßt sich einen Tag gelagertes Frischfleisch (K1) von 7 und 14 Tage gelagertem, ein beziehungsweise zweimal gefrorenem Fleisch unterscheiden (V7, V14, VV7, VV14). Bei 5 Tage gelagertem Frischfleisch (K5) ist eine eindeutige Unterscheidung von diesen Gruppen in 6 von 8 Fällen eindeutig möglich, bei 7 Tage gelagertem (K7) in 4 Fällen und ab vierzehntägiger Lagerung nicht mehr. Eine Unterscheidung der zwischen 1 und 7 Tagen gelagerten Frischfleischproben (K1, K5, K7) von einem Tag gelagertem und einmal gefrorenem Fleisch (V1) ist nicht möglich.

Betrachtet man für die Gesamtheit der Proben von den 8 Schlachttieren die Überschneidungen in der Ausprägung der Fettgewebszerreißen, das bedeutet, daß der Schweregrad der Veränderungen in einer Probe mit längerer Lagerung oder häufigerem Einfrieren gleich oder geringer ist als in der Vergleichsgruppe, finden sich folgende Ergebnisse:

Eine Unterscheidung ist in mehr als 3/4 der Fälle möglich zwischen einen beziehungsweise 5 Tage gelagertem Frischfleisch (K1, K5) und 5 bis 14 Tage gelagertem, einmal gefrorenen Fleisch (V5, V7, V14) sowie allen zweimal gefrorenen Proben (VV1 VV5, VV7, VV14). Sieben und vierzehn Tage gelagertes Frischfleisch (K7, K14) unterscheidet sich in 3/4 der Proben von 14 Tage gelagertem und zweimal gefrorenem Fleisch (VV14). Die anderen Gruppen lassen sich untereinander nicht mit 75% Wahrscheinlichkeit unterscheiden. Eine Unterscheidung in allen Fällen ist nur zwischen 1 Tag gelagertem Frischfleisch (K1) und 14 Tage gelagertem, zweimal gefrorenem Fleisch (VV14) möglich.

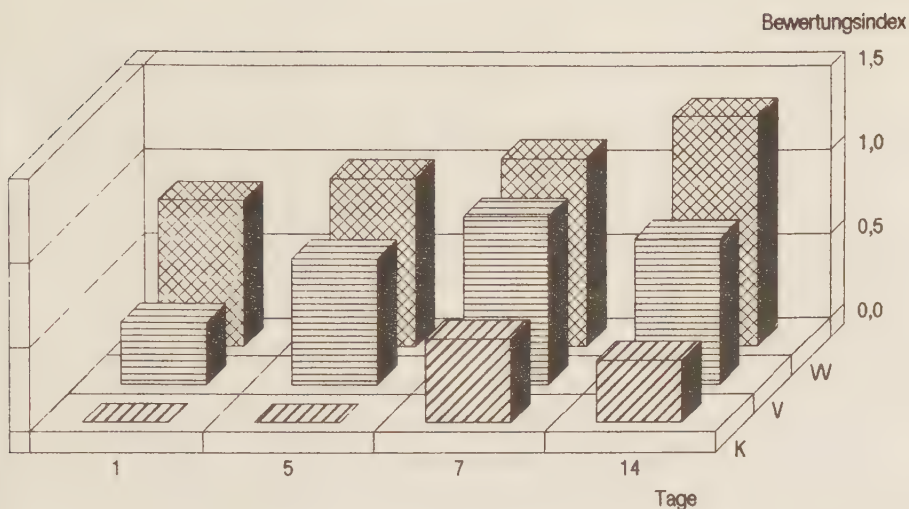


Abb. 4.15.: Zunahme der Fettgewebsveränderungen (Mittelwerte der Bewertungsindices) nach unterschiedlicher Lagerdauer und Vorbehandlung (K = Frischfleisch, V = einmal gefroren, VV = zweimal gefroren)

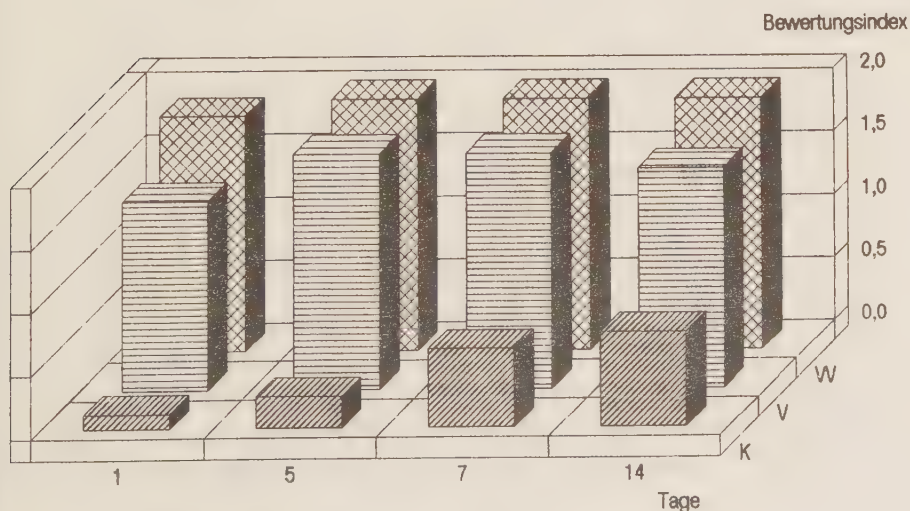


Abb. 4.16.: Austritt von freiem Fleischsaft (Mittelwerte der Bewertungsindices) nach unterschiedlicher Lagerdauer und Vorbehandlung (K = Frischfleisch, V = einmal gefroren, VV = zweimal gefroren)

4.1.4.2.3. Fleischsaft

Bei allen tiefgefrorenen Fleischproben (V,VV) kommt es nach dem Auftauen zu einem deutlichen Austritt von freiem Fleischsaft (Abb. 4.16.). Dieser nimmt in geringerem Ausmaß auch nach längerer Lagerung zu, findet sich jedoch in nicht gefrorenen Proben (K) nur in geringem Maße. Während in den längere Zeit nur bei +4 °Celsius gelagerten Frischfleischproben der Fleischsaft überwiegend im Bereich von Einzel-faserläsionen und im Bindegewebe lokalisiert ist, findet sich bei aufgetauten Fleischproben ein diffuser Austritt in das Muskelparenchym mit Auseinanderdrängen der einzelnen Muskelfasern. Darüber hinaus findet sich der Fleischsaft bei den aufgetauten Proben im Bereich des Perimysiums zum Teil mit Auseinanderdrängen des interstitiellen Bindegewebes.

4.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung unter Verwendung von Lektinen

4.2.1. Lektinbindung bei +4 °Celsius bis +7 °Celsius gelagerten Frischfleischproben (K)

Am 1. Tag nach Schlachtung (K1) findet sich eine schwache Fluoreszenz im Bereich des Sarkolemmes für die Lektine BPA und ConA, eine deutliche für die Lektine PNA, RCA2 und UEA1. An das Endomysium binden sich ConA, DBA, RCA1 und PNA schwach, BPA, GS1 und RCA2 deutlich. Bindegewebsfasern binden BPA, ConA, GS1, RCA1, PNA und UEA1 schwach, RCA2 deutlich. Im Bereich der Gefäße zeigt sich eine schwache Reaktion für GS1 und RCA2.

Am 5. Tag nach Schlachtung (K5) reagieren im Bereich des Sarkolemmes UEA1 schwach positiv, im Bereich des Endomysiums ConA, RCA1, MPA und RCA2 schwach positiv, im Bereich der Bindegewebsfasern RCA1, MPA und RCA2 schwach positiv, ConA deutlich positiv und schließlich im Bereich der Gefäße ConA, RCA1, MPA und RCA2 schwach positiv.

Am 7. Tag nach Schlachtung (K7) findet sich schwache Fluoreszenz bei Verwendung von BPA, ConA, DBA, HPA, MPA und PNA im Bereich des Sarkolemm. Das Endomysium reagiert mit BPA, GS1, RCA1 und PNA schwach positiv, mit ConA, WGA, MPA und RCA2 deutlich positiv. An Bindegewebsfasern binden sich BPA, DBA, GS1, GS2, HPA, UEA1 und UEA2 schwach, ConA, WGA, RCA1, MPA und RCA2 deutlich. An den Gefäßen zeigt sich schwache Fluoreszenz bei Verwendung von GS1 und MPA, deutliche bei Verwendung von ConA, WGA und RCA2.

Am 14. Tag nach Schlachtung (K14) findet sich keine Fluoreszenz im Bereich des Sarkolemm, eine schwache Fluoreszenz im Bereich des Endomysiums bei Verwendung von ConA, WGA, MPA und RCA2, im Bereich des Bindegewebes bei Verwendung von MPA und RCA2 und im Bereich der Gefäße für ConA, RCA1, PNA und RCA2.

4.2.2. Lektinbindung bei einmal gefrorenen Fleischproben (-18 °Celsius bis -20 °Celsius) (V)

Bei 1 Tag gelagerten und 1 Woche tiefgefrorenen Fleischproben (V1) findet sich eine schwache Fluoreszenz bei Färbung mit BPA, ConA, RCA1, GS2, HPA, PNA, RCA2, SBA, UEA1 und UEA2, eine deutliche bei DBA und MPA im Bereich des Sarkolemm. Das Endomysium reagiert mit BPA, ConA, DBA, WGA, RCA1, GS2, PNA und SBA schwach, mit GS1, MPA und RCA2 deutlich. Bindegewebsfasern fluoreszieren schwach bei Verwendung von ConA, DBA, WGA, GS1, GS2, HPA und RCA2, deutlich bei MPA. Um Gefäße zeigt sich schwache Fluoreszenz bei BPA, GS1, RCA1, MPA, PNA, SBA und UEA2.

Die 5 Tage gelagerten und 1 Woche tiefgefrorenen Fleischproben (V5) fluoreszieren im Bereich des Sarkolemm schwach bei Färbung mit BPA, ConA, WGA, GS2 und UEA1, im Bereich des Endomysiums schwach bei BPA, WGA, GS1, RCA1, MPA und RCA2, stark bei ConA, im Bereich des Bindegewebes schwach bei WGA, GS1 und RCA1, stark bei ConA und MPA, im Bereich der Gefäße schwach bei BPA, WGA, PNA und RCA2 und stark bei ConA, GS1, RCA1 und MPA.

Die 7 Tage gelagerten und 1 Woche tiefgefrorenen Fleischproben (V7) reagieren schwach im Bereich des Sarkolemmes bei Verwendung von ConA, im Bereich des Endomysiums schwach bei Verwendung von BPA, GS1, RCA1, GS2, MPA und SBA, stark bei ConA, WGA und RCA2. Im Bereich des Bindegewebes reagiert BPA, GS1, RCA1, GS2, MPA, RCA2, UEA1 und UEA2 schwach, ConA, WGA, HPA stark, im Bereich der Gefäße BPA, ConA, GS1, RCA1, GS2, MPA und SBA schwach, WGA und RCA2 stark. Die 14 Tage gelagerten und 1 Woche tiefgefrorenen Fleischproben (V14) fluoreszieren im Bereich des Sarkolemmes schwach bei Verwendung von RCA2 und SBA, im Bereich des Endomysiums schwach bei PNA, im Bereich des Bindegewebes schwach bei RCA2 und an den Gefäßen schwach bei PNA und RCA2.

4.2.3. Lektinbindung bei zweimal gefrorenen Fleischproben (-18 °Celsius bis -20 °Celsius) (VV)

Bei 1 Tag gelagerten und 2 Wochen tiefgefrorenen Fleischproben (VV1) findet sich eine schwache Fluoreszenz bei Färbung mit ConA, MPA und UEA2 im Bereich des Sarkolemmes. Das Endomysium reagiert mit ConA, WGA, RCA1, MPA, RCA2 und UEA1 schwach. Bindegewebsfasern fluoreszieren schwach bei Verwendung von DBA, RCA1, MPA und RCA2. Um Gefäße zeigt sich schwache Fluoreszenz bei WGA, MPA, PNA und RCA2, deutliche bei ConA und RCA1.

Die 5 Tage gelagerten und 1 Woche tiefgefrorenen Fleischproben (VV5) fluoreszieren im Bereich des Sarkolemmes schwach bei Färbung mit WGA, im Bereich des Endomysiums schwach bei WGA, RCA1, MPA und RCA2, stark bei ConA, im Bereich des Bindegewebes schwach bei BPA, WGA, GS2, MPA und UEA1, stark bei ConA, im Bereich der Gefäße schwach bei WGA, GS1, RCA1, MPA und RCA2 sowie stark bei ConA. Die 7 Tage gelagerten und 1 Woche tiefgefrorenen Fleischproben (VV7) reagieren schwach im Bereich des Sarkolemmes bei Verwendung von BPA, DBA, SBA und UEA1, stark bei ConA. Im Bereich des Endomysiums findet sich schwache Fluoreszenz bei Verwendung von BPA, GS1, RCA1, MPA, PNA, RCA2, starke bei ConA. Im Bereich des Bindegewebes reagiert ConA

stark, im Bereich der Gefäße BPA, GS1, RCA1, MPA, PNA und RCA2 schwach, ConA stark.

Die 14 Tage gelagerten und 1 Woche tiefgefrorenen Fleischproben (VV14) fluoreszieren im Bereich des Sarkolemm schwach bei Verwendung von SBA und UEA1, im Bereich des Endomysiums schwach bei ConA, WGA, RCA1 und RCA2, im Bereich des Bindegewebes schwach bei ConA, MPA und RCA2, sowie an den Gefäßen schwach bei ConA, WGA, MPA und RCA2.

4.2.4. Vergleichende Darstellung des Bindungsverhaltens verschiedener Lektine bei Frischfleisch- und Gefrierfleischproben in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer

Die Bindungsfähigkeit von ConA an Gefäße nimmt durch Lagerung und durch Auftau- und Gefriervorgänge zu. Die Affinität von BPA an das Endomysium nimmt mit Dauer der Lagerung und mit Anzahl der Gefrier- und Auftauvorgänge ab. Die übrigen Lektine zeigen kein einheitliches Bindungsverhalten an Sarkolemm, Endomysium, Bindegewebe oder Gefäße in Abhängigkeit von Lagerung und Gefrierprozessen. Es zeigt sich lediglich nach 14-tägiger Lagerung unabhängig von Auftau- und Gefriervorgängen eine Abnahme der Fluoreszenz. Die unterschiedlichen Lektine zeigen hier keine Unterschiede. Die verminderte Fluoreszenz am 14. Tag nach Schlachtung läßt jedoch wegen Überschneidungen mit früheren Zeitpunkten nach Schlachtung keine eindeutige zeitliche Charakterisierung der Fleischproben zu.

4.3. Elektronenmikroskopische Untersuchung

4.3.1. Elektronenoptische Veränderungen bei +4 °Celsius bis +7 °Celsius gelagerten Frischfleischproben aus Vorder- und Hintervierteln (K)

Am 1.Tag nach Schlachtung (K1) lassen sich bei 3 Proben die A- und I-Banden als elektronenoptisches Korrelat des Aktin-Myosinkomplexes sowie Z-Streifen als Korrelat der Verbindungsstrukturen zwischen den Sarkomeren klar unterscheiden. Die einzelnen Myofilamente liegen parallel, Kontinuitätsunterbrechungen der einzelnen Sarkomere finden sich nicht (Abb. 4.17.). Zwischen den Myofilamenten bestehen keine optisch leeren Spalträume.

Die Sarkomerlänge der Proben K1 schwankt zwischen 0,84 und 2,41 μm . Die Sarkomerlängen der einzelnen Proben schwanken intraindividuell um 20 % des Mittelwerts. Die Länge der anisotropen Banden beträgt zwischen 0,83 und 1,51 μm , die der I-Banden zwischen 0,1 und 0,9 μm . Die A-Bandenlänge ist zwischen 57 und 92 % der Länge der gesamten Sarkomeren. Bei einem Tier lassen sich bereits zu diesem Zeitpunkt A- und I-Banden nicht mehr sicher unterscheiden. Die Sarkomerlänge dieser Fleischprobe beträgt 0,84 μm , die Fleischprobe befindet sich damit im Vollbild der Kontraktur. Die Z-Streifen stellen sich in allen Proben als dunkel kontrastierte, ungefähr 0,06 μm breite Streifen dar. Zwischen den A-Banden finden sich die im Mittel 0,12 μm messenden M-Banden, diese lassen sich in der Probe mit maximaler Kontraktion nur noch in wenigen Sarkomeren klar abgrenzen.

Die Anordnung der Myofibrillen ist regelmäßig, sie liegen überwiegend parallel. Zwischen den einzelnen Myofibrillen finden sich nur enge Spalträume, welche fast vollständig bevorzugt von Mitochondrien, dem sarkoplasmatischen Retikulum (T- und L-System), Fettpartikeln und Glykogenanhäufungen ausgefüllt sind.

Einen Tag nach Schlachtung variiert die Größe der Mitochondrien interindividuell bereits beträchtlich. Während in 2 Proben die größte Längsausdehnung dieser Organellen im Mittel bei 0,7 μm liegt, beträgt diese in den beiden anderen Proben 1,9 μm . Insbesondere die subsarkomalen Mitochondrien sind deutlich abgerundet, während die

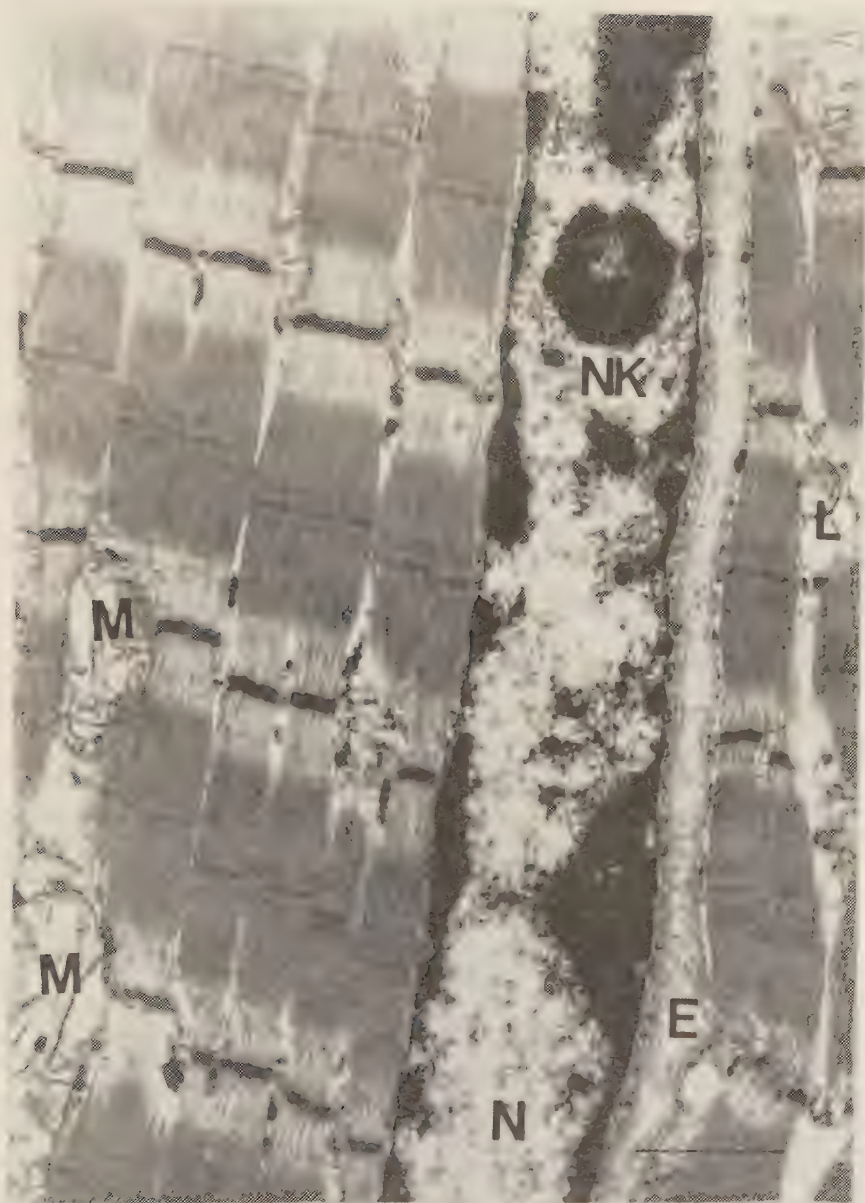


Abb. 4.17.: Ausschnittsvergrößerung einer 1 Tag gelagerten Frischfleischprobe mit parallelem Verlauf der Myofilamente, normalem Aufbau der Sarkomere, dicht anliegendem Endomysium (E), Lipidtropfen (L) zwischen den Myofilamenten, regelrecht strukturierten Mitochondrien (M) und lockerem Kern (N) mit gut abgrenzbarem Nukleolus (NK), (K1, x 6000)

zwischen den einzelnen Myofibrillen liegenden im wesentlichen oval geformt sind. Die Cristae mitochondriales sind noch regelrecht strukturiert, die Oberfläche der Cristae erscheint in den meisten Mitochondrien feingranuliert; die Cristae sind scharf durchgezeichnet. In einzelnen Mitochondrien finden sich abgeplattete, geschichtete, längliche Einschlüsse. Die dazwischen liegenden intramitochondrialen Räume sind überwiegend elektronenoptisch leer.

Im Sarkoplasma finden sich in unterschiedlicher Ausprägung Glykogengranula.

Die Muskelkerne finden sich in allen Proben in subsarkolemmaler Lage und liegen den benachbarten Myofibrillen eng an. In allen Kernen finden sich Nukleolen, welche von Euchromatin umgeben sind. In randständiger Position findet sich Heterochromatin, welches einen weitgehend geschlossenen Randsaum um den Kern bildet (Abb. 4.18.).

Nach fünftägiger Lagerung (K5) liegt die Sarkomerlänge zwischen 1,5 und 2,7 μm . Die A-Bandenlänge beträgt zwischen 0,9 und 1,5 μm , dies entspricht zwischen 57 und 95 % der Gesamtsarkomerlänge. Gegenüber den Proben K1 ist die Sarkomerlänge in 1 Fall verkürzt, in 3 Fällen verlängert. Das Verhältnis A-Bandenlänge/Sarkomerlänge als Maß für den Kontraktionszustand der Fasern ist in 2 Fällen gleich, in je einem Fall erhöht beziehungsweise erniedrigt. Die Faseranordnung ist weiterhin parallel, es finden sich nur wenige Faserzerreißen. Die Myofilamente liegen parallel. In einzelnen Fasern finden sich optisch leere Spaltbildungen im Sinne von Längsauffaserungen. Die Mitochondrien sind überwiegend, sowohl randständig als auch im Zentrum der Proben balloniert. Die Cristae mitochondriales sind in einigen Fasern zerrissen. Der perinukleäre Raum ist in allen Proben etwas verbreitert, der Kern ansonsten strukturell unverändert. Die Glykogengranula sind gegenüber K1 vermindert.

Nach siebentägiger Lagerung (K7) liegt die Sarkomerlänge zwischen 1,5 und 1,9 μm , die A-Banden Länge zwischen 0,9 und 1,5 μm . Das Verhältnis A-Banden/Sarkomerlänge liegt zwischen 0,66 und 0,9. A-Banden, I-Banden und Z-Streifen lassen sich in allen Proben klar abgrenzen. Die Myofibrillen sind unregelmäßig angeordnet. Der unmittelbar



Abb. 4.18.: Ausschnittsvergrößerung einer 1 Tag gelagerten Frischfleischprobe mit unauffälligem Plasmalemm (PL), Endomysium (E), leicht vergrößerten Mitochondrien (M), einer Kapillare (K) und erhaltener Membran um einen Kern (N) mit gut abgrenzbarem Nukleolus (NK), (K1, x 6000)

nach Schlachtung vorhandene parallele Faserverlauf findet sich nur noch in Teilen der Proben. Die Myofilamente liegen zum größten Teil noch parallel, an mehreren Stellen finden sich Längsauffaserungen, sodaß die Fasern strähnig erscheinen. Die Mitochondrien sind deutlich balloniert. Die Cristae mitochondriales sind in zahlreichen Mitochondrien nur noch unscharf gezeichnet (Abb. 4.19). Die Kernmembran ist an mehreren Stellen unterbrochen, es kommt stellenweise zur Invagination von Zytoplasma. Im Inneren der Kerne zeigt sich eine Anhäufung von scholligem Material.

Am 14. Tag (K14) nach Schlachtung liegt die Sarkomerlänge zwischen 1,5 und 2,1 μm , die A-Bandenlänge zwischen 0,7 und 1,5 μm , entsprechend einem A-Banden-/Sarkomerlängenverhältnis von zwischen 0,5 und 0,8. A-Banden, I-Banden und Z-Streifen lassen sich in allen Proben klar abgrenzen. Die intermyofibrillären Räume sind in den Proben deutlich erweitert. Die so entstehenden Spalträume sind teilweise optisch leer, zum Teil findet sich lose angeordnetes feingranuliertes Material. Zwischen den Myofilamenten finden sich ebenfalls in großen Abschnitten der Fasern Spaltbildungen. Die Mitochondrien und die Kerne zeigen die gleichen Veränderungen wie nach siebentägiger Lagerung. Glykogengranula finden sich nur noch vereinzelt zwischen den Myofibrillen (Abb. 4.20.).

4.3.2. Elektronenoptische Veränderungen bei einmal gefrorenen Fleischproben ($-18^{\circ}\text{Celsius}$ bis $-20^{\circ}\text{Celsius}$) aus Vorder- und Hintervierteln (V)

Nach eintägiger Lagerung und einwöchigem Gefrieren (V1) beträgt die Sarkomerlänge zwischen 2,2 und 2,9 μm . Die A-Bandenlänge liegt zwischen 0,8 und 1,3 μm . Die A-Bandenlänge ist damit zwischen 28 und 45 % der Sarkomerlänge. Die Myofibrillen sind in Teilen unregelmäßig angeordnet, zwischen ihnen bestehen Spalträume, die zum Teil mit feingranuliertem Material ausgefüllt sind. Zwischen den Myofilamenten zeigen sich zahlreiche Längsauffaserungen, welche den Myofibrillen ein strähniges Aussehen verleihen.

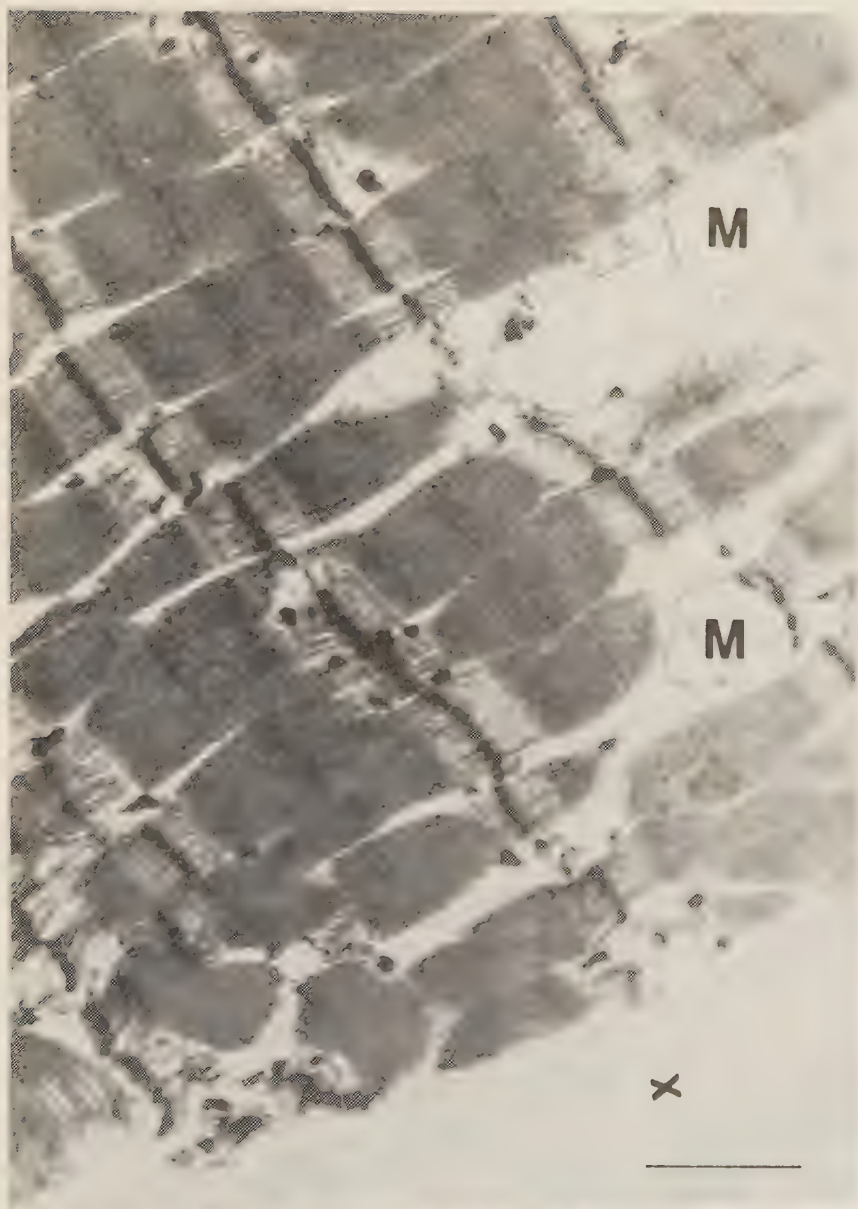


Abb. 4.19.: Ausschnittsvergrößerung einer 7 Tage gelagerten Frischfleischprobe mit leicht erweiterten intermyofibrillären Zwischenräumen, geringgradigen Zerreißen und ballonierten Mitochondrien (M) mit Verlust der Cristae mitochondriales, (K7, x 6000)

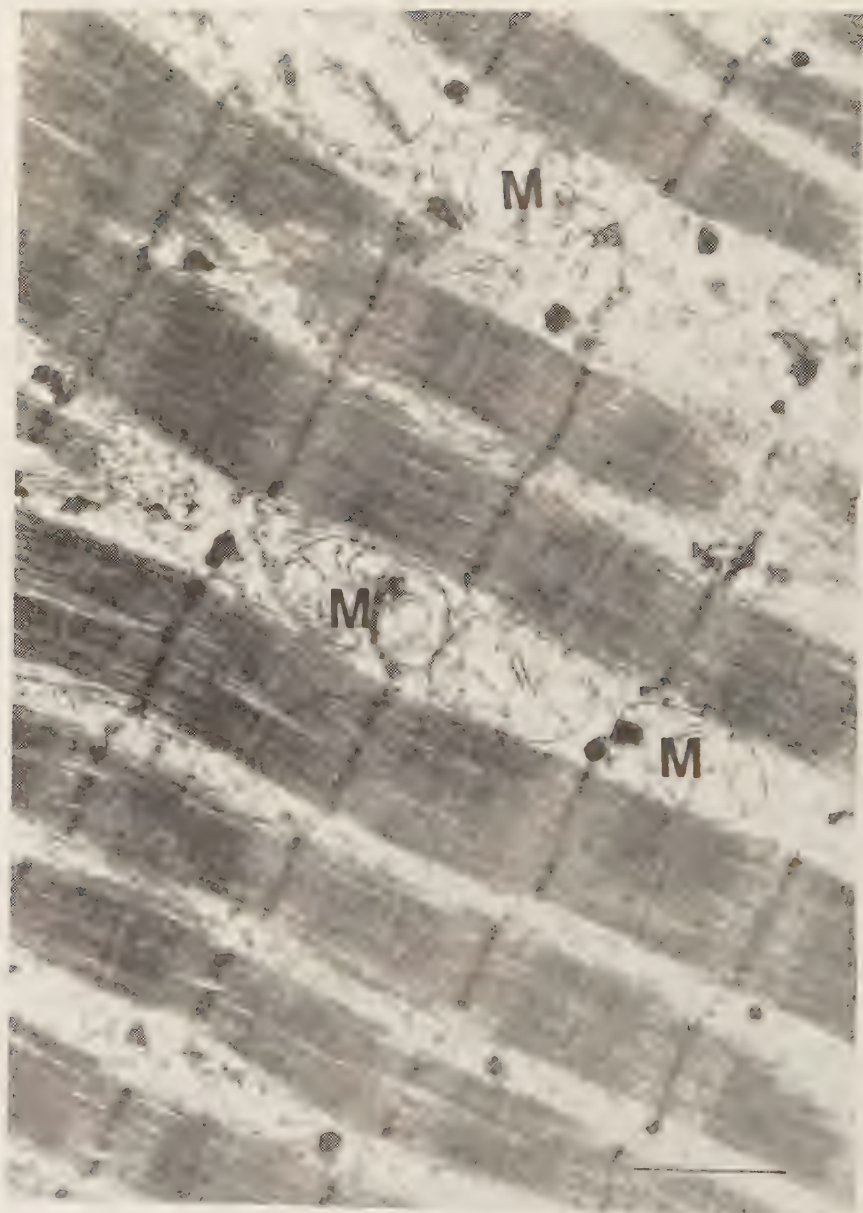


Abb. 4.20.: Ausschnittsvergrößerung einer 14 Tage gelagerten Frischfleischprobe mit "strähniger" Anordnung der Myofibrillen und ballonierten Mitochondrien (M), (K14, x 6000)

Die Mitochondrien sind deutlich aufgetrieben. Der intramitochondriale Raum ist in vielen Mitochondrien von elektronenoptisch dichten, feingranuliertem Material ausgefüllt. Aus diesem Grund lassen sich die Cristae mitochondriales oft nicht deutlich abgrenzen. Der perinukleäre Raum ist verbreitert, die Kernmembran stellenweise zerrissen.

Nach fünftägiger Lagerung und einwöchigem Gefrieren (V5) liegt die Sarkomerlänge zwischen 2,0 und 2,5 μm , die Länge der A-Banden zwischen 0,7 und 1,5 μm und beträgt damit zwischen 44 und 45 % der Sarkomerlänge. Faserverlauf, Faseranordnung, Faserzerreißen, Kerne und Mitochondrien zeigen die gleiche strukturelle Charakteristik wie die Proben V1. An mehreren Stellen findet sich freier Fleischsaft (Abb. 4.21.)

Nach siebentägiger Lagerung und einwöchigem Gefrieren (V7) schwankt die Sarkomerlänge zwischen 2,0 und 4,1 μm , die A-Bandenlänge zwischen 0,7 und 1,5 μm .

Nach vierzehntägiger Lagerung und einwöchigem Gefrieren (V14)

schwankt die Sarkomerlänge zwischen 2,3 und 2,5 μm , die A-Bandenlänge beträgt zwischen 50 und 54 % der Sarkomerlänge.

Die Veränderungen von Faserverlauf, Faserzerreißen und Mitochondrien bei den Proben V7 und V14 entsprechen qualitativ den bei V1 beschriebenen, sind jedoch quantitativ deutlicher ausgeprägt. Die Kerne zeigen einen scholligen Zerfall, die Kernmembran ist in großen Anteilen unterbrochen (Abb. 4.22.).

4.3.3. Elektronenoptische Veränderungen bei zweimal gefrorenen Fleischproben (-18 °Celsius bis -20 °Celsius) aus Vorder- und Hintervierteln (VV)

Die einen Tag im Kühlhaus gelagerten und je zweimal 1 Woche tiefgefrorenen Proben (VV1) zeigen eine Sarkomerlänge zwischen 2,2 und 3 μm , eine A-Bandenlänge zwischen 1,3 und 1,4 μm . Das Verhältnis A-Banden-/Sarkomerlänge liegt zwischen 0,46 und 0,56. Es finden sich neben Abschnitten mit parallelem Faserverlauf zahlreiche mit ungeordnetem Myofibrillenmuster. In 3 der 4 Proben haben die einzelnen

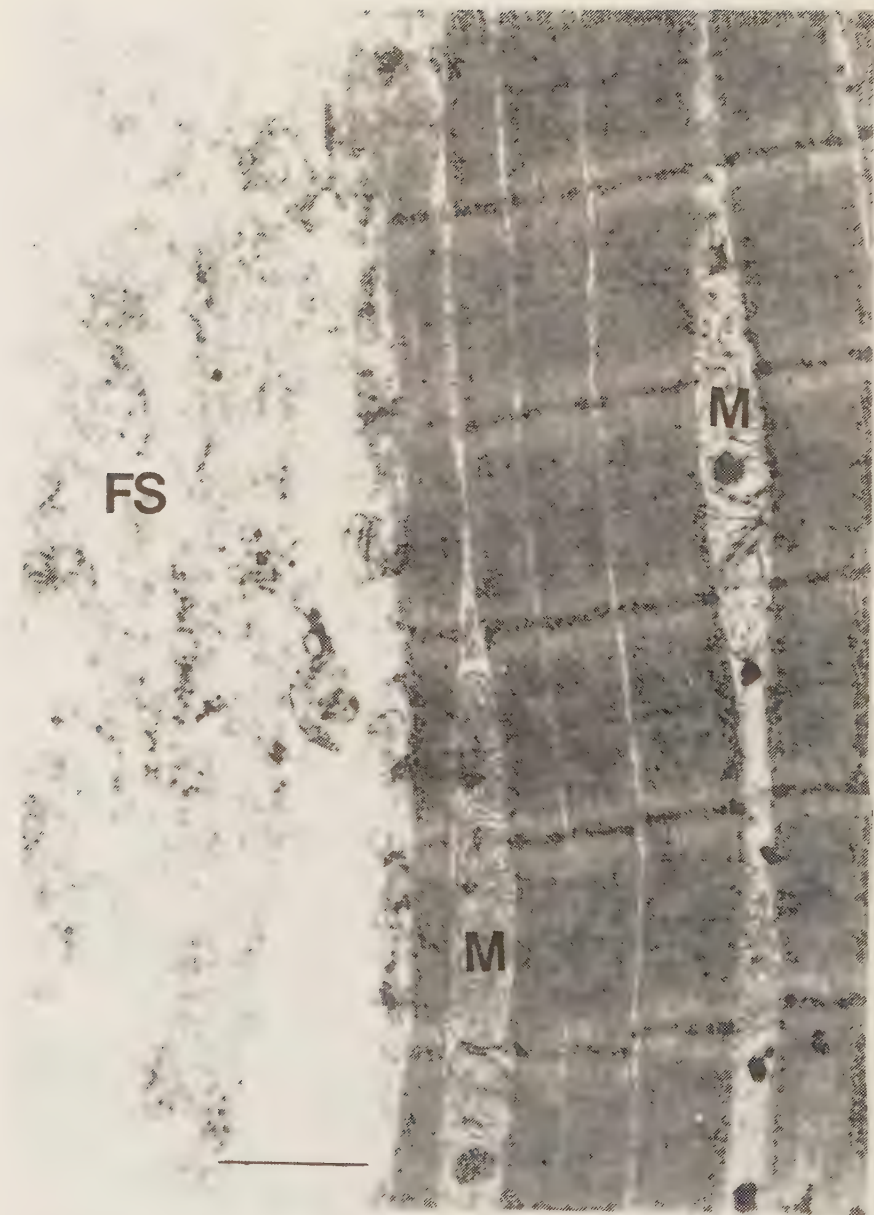


Abb. 4.21.: Ausschnittsvergrößerung einer 5 Tage gelagerten und einmal tiefgefrorenen Probe mit Austritt von freiem Fleischsaft (FS) und Hydrops der Mitochondrien (M), (V5, x 6000)



Abb. 4.22.: Ausschnittsvergrößerung einer 14 Tage gelagerten und einmal tiefgefrorenen Probe mit nicht mehr erkennbarem Aufbau der Sarkomeren, deutlichem Austritt von freiem Fleischsaft (FS) in das Interstitium, Verdichtungen der Kernstruktur (N) bei gut abgrenzbarem Nukleolus (NK) und Invaginationen der äußeren Kernmembran, (V14, x 6000)

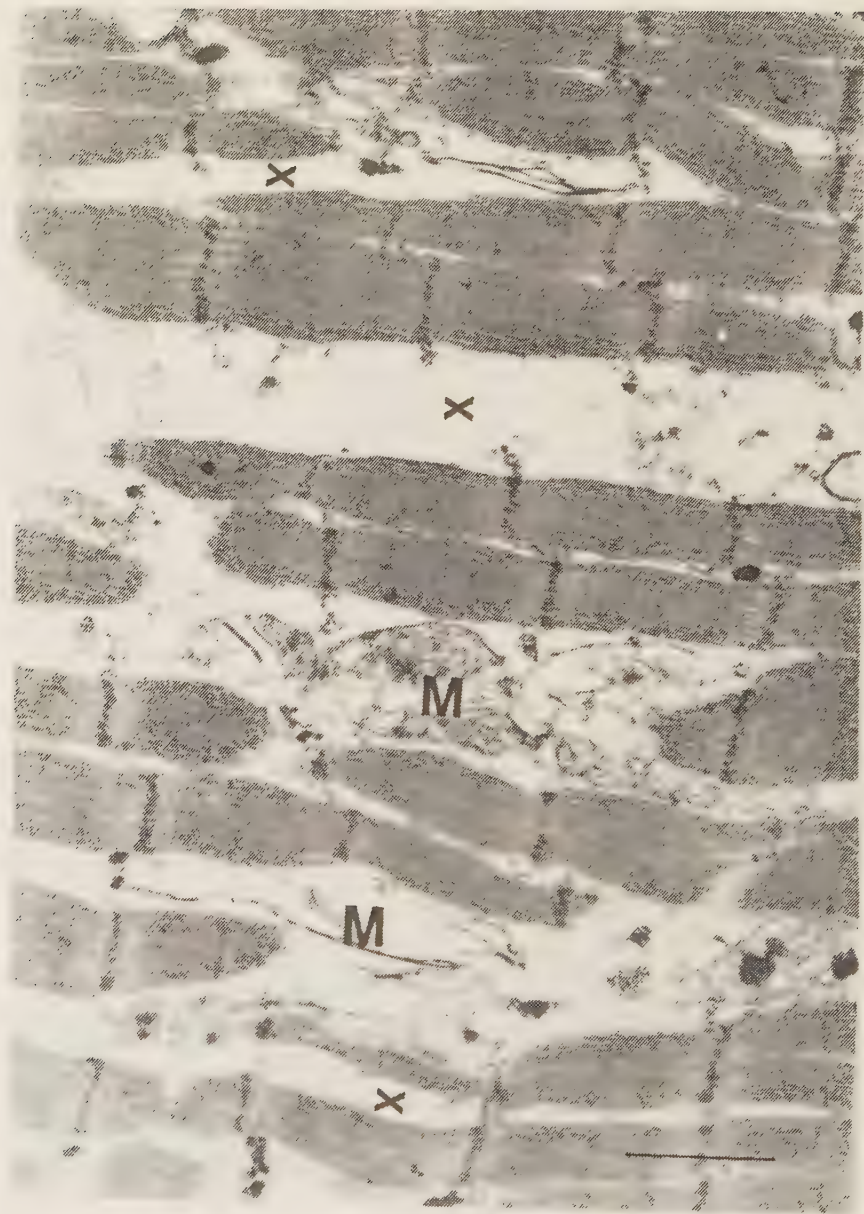


Abb. 4.23.: Ausschnittsvergrößerung einer 14 Tage gelagerten und zweimal tiefgefrorenen Probe mit stark erweiterten intermyofibrillären Spalträumen (x), stellenweisem Verlust der parallelen Faseranordnung, Faserzerreißen und ballonierten, teils fragmentierten Mitochondrien (M), (VV14, x 6000)

Myofibrillen durch Auseinanderdrängen der Myofilamente ein strähniges Aussehen. Die Mitochondrien sind überwiegend mit einem elektronenoptisch dichten Material ausgefüllt und deutlich balloniert. Die Chromatinstruktur der Kerne ist in allen Kernen verdichtet, es finden sich an zahlreichen Stellen Invaginationen des Zytoplasmas.

Nach fünftägiger Lagerung und zweimaligem Gefrieren (VV5) beträgt die Sarkomerlänge zwischen 2,0 und 2,9 μm . Die A-Banden sind zwischen 1,8 und 1,4 μm lang, entsprechend einem A-Banden-/Sarkomerlänge-Verhältnis zwischen 0,58 und 0,95. Die sonstigen Veränderungen entsprechen weitgehend denen von einen Tag gelagerten und zweimal je eine Woche gefrorenen Proben (VV1).

Die sieben Tage gelagerten und zweimal gefrorenen Proben (VV7) haben eine Sarkomerlänge zwischen 2,3 und 3,2 μm . Die A-Bandenlänge liegt zwischen 1,6 und 2,7 μm . Dies entspricht einem A-Banden-/Sarkomerlänge-Verhältnis zwischen 0,6 und 0,81. In zahlreichen Fasern sind die Sarkomere von den Z-Streifen abgelöst. Viele Myofibrillen sind in kleinere Fragmente zerfallen. Zwischen den Myofilamenten finden sich in allen bis auf 1 Probe Längsauffaserungen. Die Mitochondrien und Kernveränderungen entsprechen den bei VV1 beschriebenen. Die Sarkomerlängen der **vierzehn Tage gelagerten und zweimal gefrorenen Proben (VV14)** liegen zwischen 2,6 und 3,4 μm , die A-Bandenlängen zwischen 1,6 und 2,7 μm , entsprechend einem A-Banden-/Sarkomerlänge-Verhältnis zwischen 0,63 und 0,72.

Faserverlauf, Faseranordnung, Faserzerstörungen, Kerne und Mitochondrien zeigen die gleichen strukturellen Veränderungen wie die Proben VV7, sind allerdings quantitativ stärker ausgeprägt (Abb. 4.23.).

4.3.4. Vergleichende Darstellung der ultrastrukturellen Veränderungen zwischen Gefrier- und Frischfleisch

Die Sarkomerlängen aller ein- und zweimal gefrorenen Proben sind länger als die der einen Tag gelagerten und dann gefrorenen Frischfleischproben (K1). Dies ist bei den länger gelagerten Proben (K5, K7, K14) nicht mehr regelmäßig nachweisbar (Abb. 4.24.). Die Muskelfasern

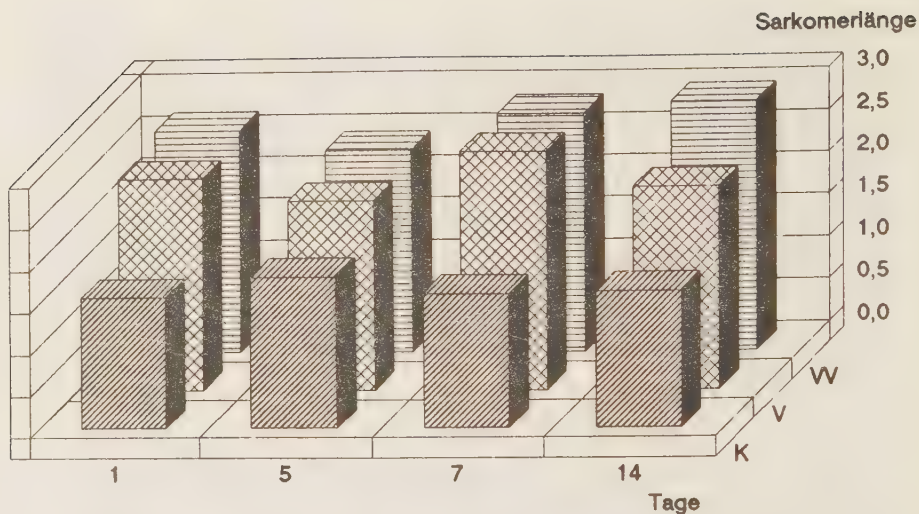


Abb. 4.24.: Sarkomerlängen (Mittelwerte der Proben) nach unterschiedlicher Lagerdauer und Vorbehandlung (K = Frischfleisch, V = einmal gefroren, VV = zweimal gefroren)

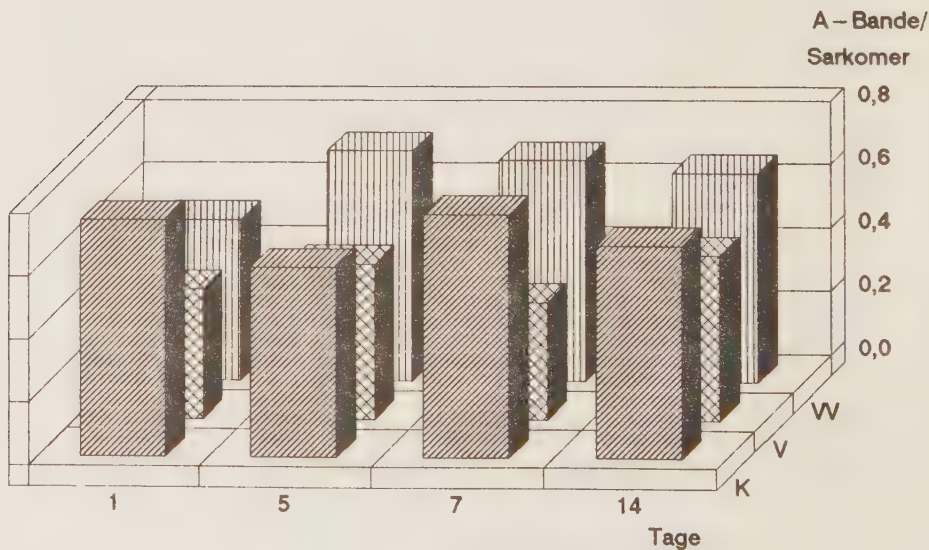


Abb. 4.25.: Verhältnis zwischen A-Bandenlänge und Sarkomerlänge (Mittelwerte der Proben) nach unterschiedlicher Lagerdauer und Vorbehandlung (K = Frischfleisch, V = einmal gefroren, VV = zweimal gefroren)

der einmal gefrorenen Proben (V1, V5, V7, V14) sind, nimmt man das Verhältnis A-Bandenlänge/Sarkomerlänge als Maß für den Kontraktionszustand der Fasern (Abb. 4.25.), sowohl im Mittel der Proben als auch bei den einzelnen Proben weniger kontrahiert als die Frischfleischproben (K1, K5, K7, K14) und die zweimal gefrorenen Proben (VV1, VV5, VV7, VV14).

Ein einheitlicher Zeitverlauf des Lysisvorgangs ist nicht feststellbar. Die aus dem gleichen Fleischteilstück entnommenen Proben zeigen nicht unbedingt eine progrediente Zunahme der Sarkomerlänge.

Die intermyofibrillären Abstände erweitern sich in den meisten Proben ab dem Zeitpunkt K14, also nach 14-tägiger Lagerung im Kühlhaus, deutlich. Diese Veränderungen treten bei den einmal und zweimal gefrorenen Proben bereits nach kürzerer Lagerung bei +4 °Celsius auf, die unterschiedlichen Proben lassen sich jedoch im Einzelfall nicht immer sicher unterscheiden.

Die Myofilamente innerhalb der einzelnen Myofibrillen weisen ab dem 5. Tag nach Schlachtung unter Kühlraumbedingungen bereits optisch leere Spaltbildungen auf, im folgenden nehmen diese in ihrer quantitativen und qualitativen Ausprägung deutlich zu, so daß es in vielen Fasern zu einer ausgesprochen strähnigen Zeichnung der Myofibrillen kommt. Derartige Veränderungen finden sich in den gefrierbehandelten Proben bereits nach eintägiger Lagerung im Kühlhaus und einwöchigem Gefrieren.

Allerdings lassen sich die sieben Tage gelagerten Proben (K7) nicht mehr eindeutig aufgrund dieses Kriteriums von den gefrorenen Proben unterscheiden.

Die Mitochondrien sind bereits nach einem Tag Lagerung deutlich geschwollen. Diese Schwellung nimmt sowohl mit der Lagerungsdauer als auch mit der Anzahl der Auftau- und Gefriervorgänge zu.

Die Glykogengranula nehmen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit ab. Die Gefriervorgänge haben keinen Einfluß auf Anzahl und Verteilung der Glykogenvorräte.

Mit zunehmender Lagerungsdauer finden sich, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß, Ablösungen der Cristae mitochondriales von der

äußeren Mitochondrienmembran. Ab siebentägiger Lagerung (K7) finden sich zahlreiche nicht mehr scharf durchgezeichnete Cristae in den Mitochondrien. Diese Veränderungen sind, wie die bereits oben beschriebenen Schwellungen der Mitochondrien, in den subsarkolemmalen Schichten der Muskelzellen betont.

Nach einmaligem und vor allem nach zweimaligem Gefrieren erscheint der intramitochondriale Raum häufig von einem elektronenoptisch dichten, feingranulierten Material ausgefüllt, welches ein ähnliches Absorptionsverhalten wie die mitochondrialen Membranen besitzt. Es lassen sich deshalb in zahlreichen Mitochondrien die Cristae nicht mehr so deutlich abgrenzen wie in den ungefrorenen Präparaten. Gleichartige Veränderungen finden sich zwar auch in diesen, allerdings in quantitativ geringerem Ausmaß.

Ab dem fünften Tag nach Schlachtung (K5) kommt es zu einer progredienten Verbreiterung des perinukleären Raums. Diese Veränderung ist nach Gefrieren etwas deutlicher ausgeprägt als unter Lagerung im Kühlhaus.

Ab dem siebten Tag (K7) nach Schlachtung und besonders nach Gefrieren ist die Membran um den Kern in größeren Abschnitten unterbrochen, es kommt zu Invaginationen von umgebendem Zytoplasma. Im Inneren des Kerns kommt es zu scholligen Depositen heterochromatischen Materials, einer zunehmenden Kernpyknose entsprechend. Der vorher vorhandene Randsaum euchromatischen Materials um den Nukleolus ist nicht mehr regelmäßig nachweisbar.

5. DISKUSSION

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung von Frischfleisch und aufgetautem Gefrierfleisch zeigen, führen unterschiedliche Lagerungsbedingungen im wesentlichen zu quantitativen morphologischen Veränderungen post mortem, jedoch nicht zum Auftreten qualitativ eindeutig unterscheidbarer einzelner struktureller Umbauvorgänge.

Die Unterscheidung im Kühlhaus gelagerter Proben von tiefgefrorenen ist morphologisch nur unter Berücksichtigung und Abwägung mehrerer Kriterien möglich.

Eine Studie, die den Einfluß einer bis zu 14-tägigen Lagerung auf die Muskelstruktur vergleicht mit den Veränderungen nach einmaligem und zweimaligem Gefrieren und Auftauen, ist im Schrifttum nicht bekannt. Die beschriebenen Befunde weisen auf 4 grundsätzliche Strukturveränderungen im Muskelgewebe, die auf die unterschiedliche Vorbehandlung der Proben zurückzuführen sind, hin:

- Austritt von Gewebswasser
- Schwellung von Zellstrukturen
- Fragmentierung von Zellstrukturen

und

- Veränderungen des Kontraktionsstatus der Muskulatur.

In der vorliegenden Untersuchung fanden sich bereits bei Lagerung im Kühlhaus folgende Veränderungen: Spaltbildungen, Querzerreißen, Verlust der parallelen Faseranordnung sowie auf elektronenoptischer Ebene Veränderungen der Zellorganellen. Derartige Umbauvorgänge postmortal sind aus der Literatur bekannt: Bereits bei normaler Lagerung - und damit ohne den Einfluß von Gefriervorgängen - kommt es nach Cullen und Mastaglia (1982) zu Hydrops der Mitochondrien mit Ballonierung, Verlust der Mitochondriendoppelmembran und später zum Unsichtbarwerden der Mitochondrienstruktur, der Mitochondriolysis. Derartige Veränderungen treten am schlachtwarmen Organismus bereits nach ungefähr 45 Minuten post mortem auf. An vorliegendem Material

war dies ebenfalls in allen Proben unabhängig von der Lagerung nachweisbar, wobei randständige Mitochondrien etwas stärker betroffen waren als zentrale. Die morphologischen Veränderungen der Mitochondrien korrelieren nach Cullen und Mastaglia (1982) mit den Änderungen der Aktivität oxidativer Enzyme.

Die Myofibrillen selbst sind beständiger bezüglich postmortalen Veränderungen. Katsaras et. al. (1984) fanden ebenfalls rasterelektronenmikroskopisch innerhalb der ersten drei Tage keine wesentlichen morphologischen Veränderungen der Muskelfibrillen von Rindermuskulatur. In den vorliegenden Proben waren ebenfalls die Myofibrillen am Tag 1 gleichmäßig geordnet, Spaltbildungen zwischen den Filamenten fanden sich in Übereinstimmung mit obigen Untersuchungen nur minimal. Bereits ab dem 6. Tag fanden Katsaras et al. (1984) intermyofibrilläre Räume, welche auf den partiellen Zerfall transversal laufender Strukturen (T-Tubulussystem und Z-Scheiben) zurückgeführt werden (Schaller und Powrie, 1971). Derartige Spaltbildungen konnten in der vorliegenden Studie ebenfalls gefunden werden. Ursächlich für die Zerstörung der Z-Scheiben soll die Freisetzung des sogenannten Ca^{++} -aktivierten Faktors (CAF) sein (Dayton et al., 1976). Die zusätzliche Freisetzung anderer, vor allem lysosomaler Enzyme führt zu Querbrüchen zwischen I-Bande und Z-Linie vor allem unter der mechanischen Belastung der Präparation der Proben. Die dadurch entstehenden Kontinuitätsunterbrechungen sind in Übereinstimmung mit Katsaras et al. (1984) nicht in allen Proben in gleichem Maß zu finden. Allerdings nimmt die Fragilität der Muskelfasern und damit die Myofibrillenfragmentierung mit der Dauer der Lagerung zu (Sayre et al., 1970; Fukazawa et al., 1969).

Der Austritt von Gewebswasser, der morphologisch zu Spaltbildungen, erweitertem Interstitium und zystischen Erweiterungen intrazellulär führt, wurde als Folge von Gefriervorgängen beschrieben (Anon und Calvello, 1978). In Abhängigkeit von der Gefriergeschwindigkeit wurde entweder eine intra- oder sowohl eine intra- als auch eine extrazelluläre Eisbildung beobachtet. Die Lokalisation der Eispartikel hängt von der erreichten Gefriertemperatur ab: bei Temperaturen bis

-10 °Celsius liegen nach Rahellic et al. (1985) die Eiskristalle überwiegend interzellulär, bei -22 °Celsius sowohl inter- als auch intrazellulär und bei niedrigeren Temperaturen überwiegend intrazellulär. Die Größe der Eispartikel und damit das Ausmaß von Faserzerreißen korreliert nach Honikel und Hamm (1983) ebenfalls negativ mit der Gefriereschwindigkeit, zusätzlich scheint die erreichte Gefriertemperatur eine Rolle zu spielen (Rahellic et al., 1985). Als Ursache für die morphologischen Veränderungen nach Gefrieren wird einerseits die mechanische Wirkung der Eiskristalle selbst diskutiert (Meryman, 1971), zum anderen die thermische Beanspruchung der zellulären Strukturen (Rubinsky et al., 1980). Hamm (1979) hingegen macht die durch Dehydratation veränderte Stabilität der Membranen für die morphologischen Veränderungen verantwortlich. Nach Mazur et al. (1972) kommt es insbesondere bei langsamem Gefrieren zur Zunahme des osmotischen Gradienten zwischen Extra- und Intrazellulärraum und damit zur Dehydratation und Schrumpfung der Zelle unter eine kritische Schwelle. Unterhalb dieser Grenze traten Membranveränderungen auf.

Ein Maximum morphologischer Veränderungen findet sich bei -22 °Celsius (Rahellic et al., 1985). Die beobachteten inter- und intra-individuellen Unterschiede in der Ausprägung von Hohlräumen und in der Fleischsaftmenge könnten nach dem oben gesagten auf unterschiedlich schnelles Gefrieren je nach Lage der Probe im gesamten Fleischstück zurückzuführen sein.

Es stellt sich die Frage, ob die interindividuellen Unterschiede in der Ausprägung morphologischer Veränderungen das Resultat von Unterschieden der Gefrier- und Auftaugeschwindigkeiten darstellen. Diese können durch Unterschiede in der Lage der untersuchten Fleischprobe im Gesamtfleischstück erklärt werden.

Die beobachtete Zunahme der Veränderungen in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer vor Gefrieren dürfte das Resultat von additiven post-mortalen Membranschäden im Rahmen der Fleischreifung sein. Eine derartige Abnahme der Membranstabilität ist bereits aus biochemischen Untersuchungen bekannt (Hamm und El-Badawi, 1984).

Veränderungen der Zellorganellen nach Gefrieren wurden bisher vor allem auf biochemischer Ebene beschrieben: Hamm und El-Badawi (1984) beschrieben eine Lösung von mitochondrialen Enzymen aus ihrer Bindung an der äußeren oder inneren Mitochondrienmembran, welche sich in einem Anstieg dieser Enzyme im Fleischsaft äußerte. Die Anfälligkeit der Mitochondrien nahm mit Dauer der Lagerung und mit Häufigkeit von Auftau- und Gefriervorgängen zu. Auf morphologischer Ebene weisen Trziska et al. (1984) an Entenmuskel den Abbau von Muskelmitochondrien an vor Gefrieren gekühltem Entenfleisch nach. Grundsätzlich waren in den untersuchten Fleischproben sämtliche Zustandsformen des kontraktilen Status im Ablauf der Zeit nachweisbar. Bereits am Tag 1 nach Schlachtung fanden sich zwischen den einzelnen Proben deutliche Unterschiede der Sarkomerlänge. Ursächlich hierfür dürften Unterschiede in zeitlichem Verlauf und in der Ausprägung der Kontrakturvorgänge (Rigorverkürzung und Kältekontraktur) sein. Diese werden auf biochemischer Ebene im wesentlichen durch ATP-Konzentration, pH-Wert und Temperatur bestimmt (Honikel und Hamm, 1983). Bei den in den vorliegenden Untersuchungen angewandten kommerziell üblichen Schlachtbedingungen mit Lagerung der Tierkörper zwischen +10 °Celsius und +30 °Celsius Raumtemperatur für einige Stunden nach der Schlachtung fällt die Temperatur im Inneren der Schlachtkörper innerhalb der ersten 4 Stunden auf Werte zwischen +15 °Celsius und +30 °Celsius ab (Petajä et al., 1985). Unter diesen Bedingungen tritt der Rigors mortis ungefähr bei einem pH-Wert von 5,5 - 5,6 und einer ATP-Verminderung auf 50 % des Ausgangswerts ein. Bei +30 °Celsius ist der Abfall des ATPs auf 50 % nach ungefähr 4 Stunden erreicht (Petajä et al., 1985). Allerdings stellt der Rigor mortis einen über Stunden ablaufenden Prozeß dar, welcher erst nach ungefähr 36 - 40 Stunden bei Rindermuskulatur abgeschlossen ist (Hecht, 1987). Dabei wird der Zeitablauf einerseits durch Umstände vor der Schlachtung wie zum Beispiel Streßfaktoren, die sekundär zu Veränderungen des Glykogengehalts führen, modifiziert (Hecht, 1987). Andererseits geht, wie oben erwähnt, die Umgebungstemperatur mit ein. Die unterschiedli-

chen Sarkomerlängen am Tag 1 nach Schlachtung lassen sich damit am ehesten als Ausdruck verschiedenartiger Zeitverläufe der Rigorbildung erklären. Zusätzlich kann in einigen Proben eine Kältekontraktur, die bei Temperaturen unter +10 °Celsius auftritt mit ursächlich verantwortlich sein. Dies ist insbesondere bei einer Probe, die bereits am Tag 1 keine klare Unterscheidung zwischen A-Bande und I-Bande mehr zeigte und welche eine maximal verkürzte Sarkomerlänge aufwies, in Erwägung zu ziehen.

Die im folgenden ablaufende Fleischreifung stellt im wesentlichen einen proteolytischen Abbau der Aktin-Myosinbrücken dar (Hamm, 1976).

Dabei scheint die Zersetzung von Troponin-T unter Einfluß des Calciumaktivierenden Faktors (CAF) eine entscheidende Rolle zu spielen.

Morphologisch führt dies, wie in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit Katsaras et al. (1984) gezeigt werden konnte, überwiegend zu Querbrüchen, der sogenannten Fragmentierung, nicht jedoch unbedingt zur Zunahme der Sarkomerlänge. Die dabei beteiligten Enzymsysteme sind abhängig von Temperatur und pH-Wert, die Fleischreifung wird damit bei Gefrieren unterbrochen.

Allerdings wird, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahelegen, die Fragmentierung nicht nur durch enzymatische Prozesse, sondern auch durch Gefriervorgänge beeinflusst.

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung unter Verwendung verschiedener Lektine zeigen, daß gegen gleiche Proteoglykangruppen gerichtete Lektine ein unterschiedliches Färbeverhalten für unterschiedliche histologische Strukturen haben können. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Studie von Capaldi et al. (1985) an menschlichem Skelettmuskel. Damit scheinen zusätzlich andere Faktoren als nur die Proteoglykanendgruppen selbst für das Färbeverhalten verantwortlich zu sein. Nach Dulaney (1979) bestimmt die sterische Konfiguration sowohl des in der Membran liegenden Proteoglykans als auch des Lektins die Affinität. Daneben spielt die Konfiguration und Größe des an das Lektin gebundenen fluoreszierenden Liganden eine Rolle für die Bindung und damit das färberische Verhalten (Briggmann und Widnell, 1983). Schließlich können

Saccharidendgruppen durch andere in der Membran liegende Saccharide maskiert werden (Novagrodsky et al., 1975).

Die Spezifitäten der einzelnen Lektine unterscheiden sich zum Teil von denen an intra vitam entnommenem menschlichen Skelettmuskel. Dies kann, nachdem selbst Blutgruppenunterschiede bei menschlichem Skelettmuskel zu Unterschieden im Bindungsverhalten führen (Schulte und Spicer, 1983), auf speziesbedingte Unterschiede in der Membranzusammensetzung zurückzuführen sein.

Zum anderen verändert sich, wie in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, das Bindungsverhalten unter dem Einfluß von Lagerung und Gefrier- sowie Auftauvorgängen. Diese Veränderungen dürften, in Analogie zu den oben angeführten Befunden von Novagrodsky et al. (1975), Briggmann und Widnell (1983) und Dulaney (1979) zum einen Ausdruck von sterischen Veränderungen zellulärer Membransysteme durch Fragmentation von Membranen, zum anderen durch Veränderungen der biochemischen Zusammensetzung von Zellbestandteilen durch autolytische Vorgänge sein. Damit scheint die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung grundsätzlich ein geeignetes Instrument zur histologischen Untersuchung von Frisch- und Gefrierfleischproben zu sein. Ob Veränderungen einzelner Lektine wie CoA und BPA für sich allein zur Unterscheidung von Fleischproben geeignet sind oder ob Befundkonstellationen eine Wertigkeit besitzen, muß allerdings, insbesondere da im Einzelfall Überlappungen zwischen Frischfleisch- und Gefrierfleischproben vorhanden sind, noch an einer größeren Zahl von Proben systematisch untersucht werden. Ein Teil der gefundenen Überlappungen zwischen den einzelnen Probeserien kann auf das geringe lichtmikroskopische Auflösungsvermögen zurückgeführt werden. Capaldi et al. (1984) weisen auf die Möglichkeit des Nachweises von Veränderungen des Bindungsverhaltens von RCA1 auf elektronenoptischer Ebene bei unauffälligem fluoreszenzmikroskopischen Befund hin. Entsprechende Untersuchungen von tierischen Fleischproben unter Verwendung von mit elektronendichten Liganden konjugierten Lektinen fehlen bisher in der Literatur.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe licht-, elektronen- und fluoreszenzmikroskopischer Methoden wurde der Einfluß einer unterschiedlich langen Lagerdauer und die Wirkung von Gefrier- und Auftauvorgängen untersucht.

Als Untersuchungsmaterial dienten Fleischproben aus Vorder- und Hintervierteln handelsüblich geschlachteter Tiere.

Die Fleischproben wurden zwischen 1 und 14 Tagen bei +4 °Celsius bis +7 °Celsius gelagert und danach entweder direkt einer histologischen Routinepräparation zugeführt (Kontrollgruppe K) oder ein- bzw. zweimal für je 1 Woche bei -18 °Celsius bis -20 °Celsius tiefgefroren. Im weiteren wurden die Proben nach Auftauen routinemäßig histologisch weiterbearbeitet (Gruppe V bzw. VV).

Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

1) Lichtmikroskopie

- 1) Sowohl im Verlauf der Lagerung als auch bei Gefrieren kommt es
 - zur Zunahme von Längsauffaserung
 - zu Faserzerreißen
 - zu Ablösungen des Endomysiums
 - zum Verlust des parallelen Faserverlaufs.

- 2) Überwiegend nach Gefrier- und Auftauvorgängen tritt freier Fleischsaft in größeren Mengen aus.

- 3) Veränderungen von Fettgewebe und Muskelfaserkernen treten selten auf.

- 4) Bis zu 5 Tage gelagerte Frischfleischproben lassen sich unter Berücksichtigung quantitativer Strukturveränderungen gegenüber mehr als 7 Tage gelagerten und mindestens einmal gefrorenen Proben unterscheiden. Als Kriterien hierzu dienen:

- Ausmaß von Längsauffaserung
- Faserzerreißen
- Ablösungen des Endomysiums

- Verlust des parallelen Faserverlaufs
- Fleischsaftaustritt

Eine Differenzierung ein- und zweimal gefrorener Fleischproben nach lichtmikroskopischen Kriterien ist nicht möglich.

II) Fluoreszenzmikroskopie

Das Färbeverhalten von Lektinen unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Lagerdauer der Fleischproben. Ebenso treten Differenzen nach unterschiedlicher Gefrierbehandlung auf. Eindeutige Veränderungen konnten in dem vorliegenden Material nicht gefunden werden.

III) Elektronenmikroskopie

1) Gelagerte Frischfleischproben (bis 14 Tage) und aufgetaute Gefrierfleischproben sind durch folgende Kriterien gekennzeichnet:

- Zunahme von Längsauffaserungen der Myofibrillen
- Querbrüche der Sarkomere überwiegend im Bereich der Z-Streifen
- Anschwellen von Mitochondrien mit Quellung der Cristae mitochondriales
- Zerstörung der Kernmembran mit Invagination von Zytoplasma

2) Die Sarkomerlängen gefrorener Proben liegen im Mittel über denen der gelagerten Frischfleischproben.

3) Der Kontraktionszustand der Proben am Tag nach Schlachtung (K1) variiert erheblich. Die morphometrischen Werte für die Sarkomerlängen lassen daher nur eine begrenzte Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Frisch- und Gefrierfleisch zu.

Unter Anwendung mehrerer Einzelkriterien läßt sich licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch bis zu 5 Tage gelagertes Frischfleisch von ein- oder zweimal gefrorenem und bei +4 °Celsius aufgetautem Gefrierfleisch unterscheiden.

7. SUMMARY

Structural Changes in Frozen Beef Skeletal Muscle: a Histological Comparison between Stored Meat and Meat Frozen and Thawed Repeated Times

Using the help of light-, fluorescence- and electronmicroscopy the influence on the characteristics of meat due to varying lengths of storing and the effect of freezing and thawing was studied. As specimens samples of front and hind quarters of commercially slaughtered beef were used.

Samples were stored between 1 and 14 days at temperatures ranging between +4 °Celsius and +7 °Celsius. Thereafter the samples were either at once prepared for routine histological examination (group K), or frozen at temperatures ranging between -18 °Celsius and -20 °Celsius for 1 or 2 weeks before being examined histologically (group V and VV).

The following results have been found:

I) Light microscopy

- 1) Following storage as well as following freezing and thawing there is
 - an increase in fiber splitting
 - tearing or rupturing of fibers
 - detachment of the endomysium
 - loss of parallel fiber arrangement
- 2) Following freezing and thawing there is a greater amount of liquid in the interstitial space and between muscle fibers present.
- 3) Changes of fat tissue and muscular nuclei are rarely seen.
- 4) Samples stored up to 5 days can be distinguished from samples stored for more than 7 days and frozen at least one time using the following criteria:
 - degree of fiber splitting

- number of fibers teared or ruptured
- extent of detachment of the endomysium
- loss of parallel fiber arrangement
- release of muscle tissue liquids

Samples frozen one time cannot be distinguished from those frozen two times.

II) Fluorescencemicroscopy

Binding of lectins varies with storing. Characteristics also changed by freezing and thawing. A uniform pattern of staining has not been found.

III) Electronmicroscopy

1) Meat samples stored (up to 14 days) and samples frozen have the following characteristics:

- dissection of the myofibrils
- rupturing of the sarcomers above all in the region of the Z-line
- swelling of the mitochondria with broadening of the mitochondrial cristae
- destruction of the nuclear membrane with invagination of cytoplasm

2) The mean sarcomer-length of the muscles frozen is longer than that of fresh meat.

3) Contraction varies widely between different samples examined at the first day after slaughter (K1). Measuring of sarcomer length is only of limited value for distinguishing fresh meat from frozen meat.

Using a combination of the criteria established in this study fresh meat stored up to 5 days can be distinguished from meat, that was frozen and thawed at 4 °Celsius, by means of light-, fluorescence- and electronmicroscopy.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, R.D., Denny-Brown, D., Pearson, C.M., 1975:
Diseases of muscle. A study in pathology 3rd edition Harper and Row,
New York, 81 - 109
- Anderson-Cedergren, E., 1959: Ultrastructure of motor end plate and
sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by
three-dimensional reconstructions from serial sections.
J. Ultrastruct. Res. (Suppl) 1, 1 - 191
- Anon, M., Calvelo, A., 1980: Freezing rate effects on the drip loss of
frozen beef.
Meat Sci 4, 1 - 14
- Appleyard, S.T., Dunn, M.J., Dubowitz, V., Scott, M.L., Pittman, S.J.,
Shotton, D.M., 1984: Monoclonal antibodies detect a spectrin-like
protein in normal and dystrophic human skeletal muscle.
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 81, 776 - 780
- Bargmann, W., 1977: Histologie und mikroskopische Anatomie des
Menschen.
Histologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 152 - 165
- Barondes, S.H., 1981: Lectins: their multiple endogenous cellular
functions.
Ann. Rev. Biochem. 50, 207 - 231
- Bate-Smith, E.C., Bendall, J.R., 1956: Changes in muscle after death.
Br. Med. Bull. 12, 230 - 235
- Bechtel, P.J., Frederick, C., Parrish, J.R., 1983: Effects of postmortem
storage and temperature on muscle protein degradation: Analysis by
sds-gel-electrophoresis.
J. Food Sci. 48, 294 - 297
- Bendall, J.R., 1973: The biochemistry of rigor mortis and cold
contracture.
in: Bericht 19. Europ. Fleischforscherkongreß, Paris 1, 1 - 27
- Bendall, J.R., 1978: Electrical stimulation of carcasses as a method of
avoiding the cold shortening and toughness of meat.
in: Ber. 24. Europ. Fleischforscherkongress, Kulmbach 2, 3 - 8
- Bertolotto, A., Palmucci, L., Doriguzzi, C., Mongini, F., Gagnor, E., Del
Rosso, M., Tarone, G., 1983: Laminin and Fibronectin distribution in
normal and pathological human muscle.
J. Neurol. Sci. 60, 337 - 382

- Bonilla, E., Schotland, D.L., 1970: Histochemical diagnosis of muscle phosphofructokinase deficiency.
Arch. Neurol. 22, 8 - 12
- Bonilla, E., Schotland, D.L., Wakayama, J., 1978: Duchenne Dystrophy: focal alterations in the distribution of Concanavalin A binding sites at the muscle cell surface.
Ann. Neurology 4, 117 - 123
- Bowman, W., 1840: On the minute structure and movements of voluntary muscle.
Philos. Trans. R. Soc. London (Biol.) 130, 457 - 501
- Briggmann, J.V., Wldnell, C.C., 1983: A comparison of direct and indirect techniques using ferritin conjugated ligands for the localization of Concanavalin A binding sites on isolated hepatocyte plasma membranes.
J. Histochem. Cytochem. 5, 579 - 590
- Buege, D.R., Marsh, B.B., 1975: Mitochondrial calcium and postmortem muscle shortening.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 478 - 482
- Capaldi, M.J., Dunn, M., Sewry, C.A., Dubowitz, V., 1984: Binding of ricinus communis I lectin to the muscle cell plasma membrane in diseased muscle.
J. Neurol. Sci. 64, 315 - 324
- Capaldi, M.J., Dunn, M.J., Sewry, C.A., Dubowitz, V., 1984: Altered binding of ricinus communis I lectin by muscle membranes in Duchenne muscular dystrophy.
J. Neurol. Sci. 63, 129 - 142
- Capaldi, M.J., Dunn, M.J., Sewry, C.A., Dubowitz, V., 1985: Lectin binding in human skeletal muscle: a comparison of 15 different lectins.
Histochem. J. 17, 81 - 92
- Ceri, H., Shadle, P.J., Koliber, D., Barondes, S.H., 1979: Extracellular lectin and its glycosaminoglycan inhibitor in chick muscle cultures.
J. Supramol. Struc. 11, 61 - 67
- Ceri, H., Roberts, D., 1985: Endogenous lectins in normal and dystrophic muscle development.
Muscle and Nerve 8, 710 - 713
- Cullen, M.J., Mastaglia, F.L., 1982: Pathological reactions of skeletal muscle.
in: Skeletal muscle pathology (ed.: Mastaglia, F.L., Sir Walton, J.), Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York, 88 - 139

- Currie, R.W., Wolfe, F.H., 1980: Rigor related changes in mechanical properties (tensile and adhesive) and extracellular space in beef muscle.
Meat Sci. 4, 123 - 143
- Davey, C.L., Gilbert, K.V., 1967: Structural changes in meat during aging.
J. of Food Techn. 2, 57 - 63
- Davey, C.L., Gilbert, K.V., 1969: Studies in meat tenderness. 7. Changes in the fine structure of meat during aging.
J. of Food Sci. 34, 69 - 74
- Davey, C.L., Gilbert, K.V., 1974: The mechanism of cold induced shortening in beef muscle.
J. of Food Tech. 9, 51 - 58
- Davey, C.L., Gilbert, K.V., 1975: Cold shortening and cooking changes in beef.
J. Sci. Food Agric. 26, 761 - 767
- Dayton, W.R., Reville, W.J., Goll, D.E., Stromer, M.H., 1976: A Ca^{++} activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme.
Biochemistry 15, 2159 - 2167
- Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G., Montreuil, J., 1981: Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins.
Eur. J. Biochem. 117, 41 - 55
- Denbury, J.F., 1980: Cockroach muscle hemagglutinins - candidate recognition macromolecules.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 33 - 40
- DiMauro, S., Bonilla, E., Lee, C.P., Schotland, D.L., Scarpa, A., Conn jr., H., Chances, B., 1976: Luft's disease: Further biochemical and ultrastructural studies of skeletal muscle in the second case.
J. Neurol. Sci. 27, 217 - 232
- Dubowitz, V., 1985: Normal Muscle.
in: Muscle Biopsy: A Practical Approach, 2nd edition, Baillière Tindall, London, Philadelphia, Toronto, 41 - 81
- Dulaney, J.T., 1975: Binding interactions of glycoproteins with lectins.
Molec. Cell. Biochem. 21, 43 - 63

- Dunn, M.J., Sewry, C.A., Dubowitz, V., 1982: Cytochemical studies of lectin binding by diseased human muscle.
J. Neurol. Sci. 55, 147 - 159
- Eisenberg, R.S., 1983: Impedance measurements of the electrical structure of skeletal muscle.
Handbook of Physiology. Skeletal muscle. American Physiological Soc. Baltimore, Williams and Wilkins 73 - 112
- Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M., Adelstein, R.S., 1973: Complete amino acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2678 -2691
- Ernster, L., Schatz, G., 1981: Mitochondria - a historical review.
J. Cell.Biol. 91, 227 - 255
- Franzini-Armstrong, C., 1971: Studies of the triad. II. Penetration of tracers into the junctional gap.
J. Cell. Biol. 49, 196 - 203
- Franzini-Armstrong, C., 1973: Membranous systems in muscle fibers. The structure and function of muscle (ed. Bourne, G.H.), Academic, New York 2, 531 - 619
- Fukazawa, T., Briskey, E.J., Takahashi, K., Yasui, T., 1969: Treatment and post-mortem aging effects on the Z-line from chicken pectoral muscle.
J. Food Sci. 34, 606 - 610
- Gallagher, J.T., 1984: Carbohydrate-binding properties of lectins: a possible approach to lectin nomenclature and classification.
Bioscience Reports 4, 621 - 638
- Goldstein, I.J., Hammarstrom, S., Sunbald, G., 1975: Precipitation and carbohydrate binding studies on wheat germ agglutinin.
Biochem. Biophys. Acta 405, 53 - 61
- Goldstein, I.J., Hayes, C.E., 1978: The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals.
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35, 127 - 340
- Gottesmann, P., Hamm, R., 1982: Neue biochemische Methoden zur Unterscheidung zwischen Frischfleisch und aufgetautem Gefrierfleisch.
Fleischwirtschaft 62, 1301 - 1305
- Greaser, M.L., 1977: Mechanism of calcium uptake and binding of sarcoplasmic reticulum and mitochondria.
Proceed. 30th Ann. Recipr. Meat Confer. (AMSA), Auburn, Alabama, 149 - 154

Gulati, A.K., Reddi, A.H., Zalewski, A.A., 1983: Changes in the basement zone components during skeletal muscle fiber degeneration and regeneration.

J. Cell. Biol. 97, 957 - 962

Hamm, R., 1976 Neue Ergebnisse zur Biochemie des Fleisches: Veränderungen nach dem Schlachten.

Fleischwirtschaft 56, 79 - 84

Hamm, R., 1979: Die Biochemie des Muskelcalciums und ihre Bedeutung für die Fleischqualität, Teil 1.

Fleischwirtschaft 59, 393 - 398

Hamm, R., 1979: Die Biochemie des Muskelcalciums und ihre Bedeutung für die Fleischqualität, Teil 2.

Fleischwirtschaft 59, 561 - 566

Hamm, R., Honikel, K.O., Fischer, Ch., Hamid, A., 1980: Veränderungen des Rindfleisches nach dem Schlachten und ihre Auswirkungen auf das Wasserbindungsvermögen.

Fleischwirtschaft 60, 1567 - 1576

Hamm, R., Gottesmann, D., Kijowski, J., 1982: Einfrieren und Auftauen von Fleisch.

Fleischwirtschaft 62, 982 - 987

Hamm, R., El-Badawi, A.A., 1984: Aktivität und subzelluläre Verteilung einiger Mitochondrienenzyme im Rindermuskel.

Fleischwirtschaft 64, 715 - 721

Hamm, R., Honikel, K.O., Cheon-Jel, K., 1984: Veränderungen im Schweine- und Rindermuskel nach dem Schlachten.

Fleischwirtschaft 64, 1387 - 1393

Hamm, R., 1986: Aktuelle Fragen der internationalen Fleischforschung.

Fleischwirtschaft 66, 408 - 413

Hasselbach, W., 1977: The sarcoplasmic reticulum calcium pump. A most efficient ion translocation system.

Biophys. Struct. Mech. 3, 43 - 54

Hay, J.D., Currie, R.W., Wolfe, F.H., Sanders, E.J., 1973: Effect of postmortem aging on chicken myofibrils.

J. Food Sci. 38, 981 - 990

Hecht, H., 1987: Reifung und Zartheit von Fleisch.

Fleischwirtschaft 67, 534 - 546

Honikel, K.O., Hamm, R., 1978: Einfluß des Kühlens auf die Eigenschaften von frisch geschlachtetem Rindfleisch. Fleischwirtschaft 58, 712 - 719

Honikel, K.O., Hamm, R., 1978: Influence of cooling and freezing of minced pre-rigor muscle on the breakdown of ATP and glycogen. Meat Sci. 2, 181 - 192

Honikel, K.O., Fischer, Ch., Hamid, A., Hamm, R., 1981: Influence of postmortem changes in bovine muscle on the waterholding capacity of beef. Postmortem storage of muscle at 20 °Celsius. J. Food Sci. 46, 2 - 5

Honikel, K.O., Hamid, A., Fischer, Ch., Hamm, R., 1981: Influence of postmortem changes in bovine muscle on the waterholding capacity of beef. Postmortem storage of muscle at various temperatures between 0 and 30 °Celsius. J. Food Sci. 46, 33 - 36

Honikel, K.O., 1983: 28. Europäischer Fleischforscherkongress in Madrid VII. Kälteanwendungen. Fleischwirtschaft 63, 880 - 883

Honikel, K.O., Hamm, R., 1983: Kühlen, Gefrieren und Auftauen. Kolloidchemische Aspekte der Fleischqualität. Fleischwirtschaft 63, 1118 - 1127

Honikel, K.O., Roncales-Su, P., Hamm, R., 1983: The influence of temperature on shortening and rigor onset in beef muscle. Meat Sci. 8, 221 - 241

Huxley, A.F., Niedergerke, R., 1954: Structural changes in muscle during contraction. Nature 173, 971 - 972

Huxley, H.E., Hanson, J., 1954: Changes in cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. Nature 173, 973 - 976

Huxley, H.E., 1957: The double array of filaments in cross-striated muscle. J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 631 - 648

Huxley, H.E., 1963: Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments of striated muscle. J. Mol. Biol. 7, 281 - 308

Huxley, H.E., 1964: Evidence for continuity between the central elements of triads and extracellular space in frog sartorius muscle. Nature (London) 202, 1067 - 1071

Huxley, H.E., 1969: The mechanism of muscular contraction.
Science 164, 1356 - 1366

Ingram, M., 1973: Probleme bei der Kühlung des Fleisches.
Arch. Lebensmittel Hyg. 24, 269 - 272

James, S.J., Nair, C., Bailey, C., 1985: The effect of the rate of freezing and thawing on the drip loss from frozen beef.
in: Thermal processing and quality of foods [22ref En] [ARC, Meat Res. Inst. Langford, Bristol, BS 187DY, UK], 807 - 813

Jolley, P.D., Honikel, K.O., Hamm, R., 1980: Influence of temperature on the rate of post-mortem metabolism and waterholding capacity of bovine neck muscles.
Meat Sci. 5, 99 - 107

Jorgensen, A.O., Kalnins, V., MacLennan, D.H., 1979: Localization of sarcoplasmic reticulum proteins in rat skeletal muscle by immunofluorescence.
J. Cell. Biol. 80, 372 - 384

Karlson, P., 1972: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.
Thieme Verlag, Stuttgart 8, 405

Katsaras, K., Tetzlaff, G., Budras, K.D., 1984: Morphologische Veränderungen der Rindermuskulatur während der Reifung.
Fleischwirtschaft 64, 1252 - 1256

Köttgen, E., Bauer, Ch., Reutter W., Gerok, W., 1979: Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen Bedeutung von Glykoproteinen.
Klin. Wschr. 57, 151 - 159

Lacourt, M.A., Carpenter, J., 1973: Influence of ante rigor freezing and thawing temperature and time on beef muscle contraction.
Food Sci. Techn. Abstr. 4, 686

Lazarides, E., 1980: Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space.
Nature (London) 283, 249 - 256

Lee, C.P., Martens, M.E., 1986: Mitochondrial respiration and energy metabolism in muscle.
Myology (New York) 643 - 671

Lehninger, A.L., 1977:
in: Biochemistry, 2nd edition, New York, Worth Publ. 760 - 761

Liebich, H.G., Kieslich, N., 1985: Strukturveränderungen an Muskelgewebe vom Rind nach Kälteeinwirkung. Ein histologischer Vergleich zwischen Frisch- und aufgetautem Gefrierfleisch.
1. Elektronische Bildanalyse der Sarkomeren.
Fleischwirtschaft 65, 845 - 848

Liebich, H.G., Kieslich, N., 1985: Strukturveränderungen an Muskelgewebe vom Rind nach Kälteeinwirkung. Ein histologischer Vergleich zwischen Frisch- und aufgetautem Gefrierfleisch.
2. Elektronenmikroskopische Befunde an Frischfleisch.
Fleischwirtschaft 65, 1140 - 1143

Liebich, H.G., Kieslich, N., 1985: Strukturveränderungen an Muskelgewebe vom Rind nach Kälteeinwirkung. Ein histologischer Vergleich zwischen Frisch- und aufgetautem Gefrierfleisch.
3. Elektronenmikroskopische Befunde an aufgetautem Gefrierfleisch.
Fleischwirtschaft 65, 1395 - 1397

Locker, R.H., Haygard, C.J., 1963: A cold shortening effect on beef muscles.
J. Sci. Food Agric. 14, 787 - 793

Locker, R.H., Daines, G.J., 1975: Rigor mortis in beef sternomandibularis muscle at 37 °Celsius.
J. Sci. Food Agric. 26, 1721 - 1733

Mannherz, H.G., Holmes, K.C., 1976: Muskeln arbeiten nach dem Prinzip eines Ruderers. Der molekulare Mechanismus der Muskelkontraktion.
Umschau 7, 203 - 208

Marsh, B.B., 1983: Effects of early postmortem muscle pH and temperature on meat tenderness.
in: Proc. 36th annual reciprocal meat conference of the American Meat Science Assoc. published by National Life Stock and Meat Board, Chicago, Illinois, USA, 131 - 135

Mauro, A., Adams, W.R., 1961: The structure of the sarcolemma of the frog skeletal muscle fiber.
J. Biophys. Biochem. Cytol. (Suppl) 10, 175 - 185

Mazur, P., Leibo, S.P., Chu, E.H.Y., 1972: A two factor hypothesis of freezing injury - evidence from chinese hamster tissue culture cells.
Exp. Cell. Res. 71, 345 - 355

Meier, E., 1983: Cryofixation von Skelettmuskelgewebe. Strukturelle Untersuchungen nach unterschiedlicher Kälteeinwirkung.
Med. Vet. Diss., Ludwig Maximilians-Universität, München

Meryman, H.T., 1971: Osmotic stress as mechanism of freezing injury.
Cryobiology 8, 459 - 500

- Novadgradsky, A., Lotan, R., Ravid, A., Sharon, N., 1975: Peanut agglutinin. A new mitogen that binds to galaktosyl sites exposed after neuraminidase treatment.
J. Immun. 115, 1243 - 1248
- Nowak, T.P., Kobiler, D., Rad, L.E., Barondes, S.H., 1977: Developmentally regulated lectin from embryogenic chick pectoral muscle.
J. Biol. Chem. 252, 6026 - 6030
- Paljarvi, L., Karlalainen, K., Kalimo, H., 1984: Altered muscle saccaride pattern in α -linked muscular dystrophy.
Arch. Neurol. 41, 39 - 42
- Peachy, L.D., 1965: The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius.
J. Cell. Biol. 25, 209 - 231
- Pearson, A.M., Kana, T., Cornforth, O.P., Merkel, R.A., Porzio, M.A., 1977: Effects of pH and temperature on calcium uptake and release by sarcoplasmic reticulum.
Proceed. 30th Ann. Recipr. Meat Confer. (AMSA), Auburn, Alabama, 155 - 165
- Pena, S.D.J., Gordon, B.B., Karpall, G., Carpenter, S., 1981: Lectin histochemistry of human skeletal muscle.
J. Histochem. Cytochem. 29, 542 - 546
- Penny, F., Dransfield, E., 1979: Relationship between toughness and Troponin T in conditioned beef.
Meat Sci. 3, 135 - 141
- Penny, I.F., 1974: The action of muscle protease on the myofibrillar proteins of bovine muscle.
J. of Sci. Food Agric. 25, 1273 - 1284
- Petajä, E., Kukkonen, E., Puolanne, E., 1985: Effect of post-mortem temperature on beef tenderness.
Meat Sci. 12, 145 - 154
- Ponder, B.A., 1984: Lectin histochemistry.
in: Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology (ed: Polak, J.M., Van Noorden, S.) Bristol, London, Boston: Wright-PSG, 129 - 142
- Porter, K.R., Palade, G.E., 1957: III. Studies of endoplasmic reticulum.
J. Biophys. Biochem. Cytol. (Suppl) 3, 269 - 300

- Quali, A., Rochdi, A., Bonnet, M., Kopp, J., Valin, C., 1983: Effect of freezing rate and temperature on the myofibrillar structure of bovine striated muscle.
in: Refrigeration in the service of man. XVth International Congress of Refrigeration. Paris 1983 3, 425 - 430
- Rahelic, S., Gwaad, A.H., Puac, S., 1985: Structure of beef longissimus dorsi muscle frozen at various temperatures: part I- Histological changes in muscle frozen at -10, -22, -33, -78 and -115 °Celsius.
Meat Sci. 14, 63 - 72
- Rahelic, S., Gwaad, A.H., Puac, S., 1985: Structure of beef longissimus dorsi muscle frozen at various temperatures: part II Ultrastructure of muscle frozen at -10, -22, -33, -78 and -115 °Celsius.
Meat Sci. 14, 73 - 81
- Riedel, U., 1957: Kalorimetrische Untersuchungen über das Gefrieren von Fleisch.
Kältetechnik 9, 38 - 42
- Rubenstein, J.L.R., Smith, B.A., McConnell, H.M., 1979: Lateral diffusion in binary mixtures of cholesterol and phosphatidylcholines.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 15 - 18
- Rubinsky, B., Cravalho, E.G., Milliv, B., 1980: Thermal stresses in frozen organs.
Cryobiol. 17, 66 - 73
- Sanes, J.R., Cheney, J.M., 1982: Lectin binding reveals a synapse-specific carbohydrate in skeletal muscle.
Nature (London) 300, 646 - 647
- Sayre, R.N., 1970: Chicken myofibril fragmentation in relation to factors influencing tenderness.
J. Food Sci. 35, 7 - 14
- Schaller, D.R., Powrie, W.D., 1971: Scanning electron microscopy of skeletal muscle from rainbow trout, turkey and beef.
J. of Food Sci. 36, 552 -562
- Schulte, B.A., Spicer, S.S., 1983: Light microscopic histochemical detection of sugar residues in secretory glycoproteins of rodent and human tracheal glands with lectin-horseradish peroxidase conjugates and the galactose oxidase-schiff sequence.
J. Histochem. Cytochem. 31, 391 - 403
- Stephens, H.R., Duance, V.C., Dunn, M.J., Bailey, A.J., Dubowitz, V., 1982: Collagen types in neuromuscular diseases.
J. Neurol. Sci. 53, 45 - 62

Stromer, M.H., Goll, D.E., 1967: Molecular properties of postmortem muscle. 3. Electron microscopy of myofibrils.
J. of Food Sci. 32, 386 - 389

Suzuki, T., 1976: An ultra microscopy study on rigor mortis.
Forensic Sci. 8, 207 - 216

Tokuyasu, K.T., Dutton, A.H., Singer, S.J., 1983: Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeletin) localization and intermediate filament organization in chicken skeletal muscle.
J. Cell. Biol. 96, 1736 - 1742

Trziszka, T., Smolinska, T., Czarna, Z., Kopec, W., 1984: Postmortem metabolism and ultrastructural changes in frozen duck muscle tissue: ultramicroscopic studies.
Arch. Geflügelk. 48, 93 - 99

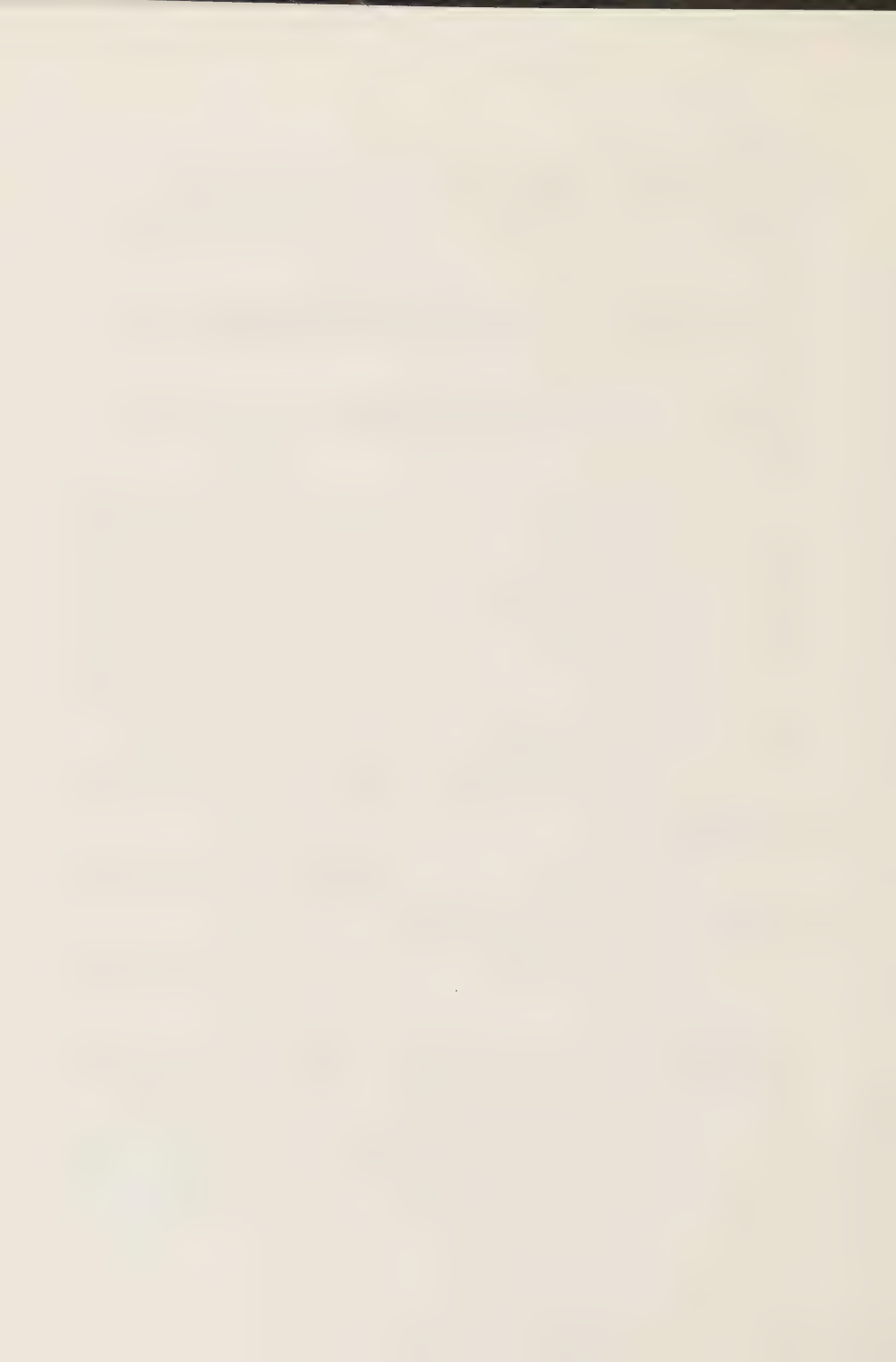
Varriano-Marston, E., Davis, G.A., Hutchinson, T.E., Gordon, J., 1976: Scanning electron microscopy of aged free and restrained bovine muscle.
J. of Food Sci. 41, 601 - 605

Weeds, A.G., Lowey, S., 1971: Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin.
J. Mol.Biol. 61, 701 - 725

Wirth, F., 1979: Kühlen, Gefrieren, Lagern und Auftauen von Fleisch nach heutigem Erkenntnisstand.
Fleischwirtschaft 59, 1787 - 1797

Wirth, F., 1980: Temperaturbehandlung von Fleisch und Fleischerzeugnissen.
Fleischwirtschaft 60, 13 - 16

Zacks, S.L., Sheff, M.F., Saito, A., 1973: Structure and staining characteristics of myofiber external lamina.
J. Histochem. Cytochem. 21, 703 - 714



ABKÜRZUNGEN

A-Banden	=	Anisokore Banden
ADP	=	Adenosindiphosphat
ATP	=	Adenosintriphosphat
BPA	=	Bauhinia purpurea agglutinin
ConA	=	Concanavalin A
DBA	=	Dolichos biflorus agglutinin
EZR	=	Extrazellularraum
GS 1	=	Griffonia simplicifolia 1
GS 2	=	Griffonia simplicifolia 2
H.E.	=	Hämatoxylin-Eosin
HPA	=	Helix pomatia agglutinin
I-Banden	=	Isokore Banden
IZR	=	Intrazellularraum
K	=	Kontrollgruppe
KRP	=	Kreatinphosphat
MPA	=	Maclura pomifera agglutinin
nm	=	Nanometer
PNA	=	Arachis hypogaea agglutinin
RCA1	=	Ricinus communis agglutinin
RCA2	=	Ricinus communis toxin
SBA	=	Glycine max agglutinin
UEA2	=	Ulex europaeus agglutinin 2
V	=	Versuchsgruppe (einmal gefroren)
VV	=	Versuchsgruppe (zweimal gefroren)
WGA	=	Triticum vulgare
µm	=	Mikrometer

DANKSAGUNG

Ich darf Herrn Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken. Herrn Prof. Dr. H.G. Liebich möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die wissenschaftliche Beratung und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch Frl. Winkler und Frl. Settles, die mich bei den umfangreichen Arbeiten in sehr zuverlässiger und dankenswerter Weise unterstützt haben.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls danken.

LEBENS LAUF

Angelika Felber, geb. am 11.4.60

in Olching / Bayern

Eltern: Ingeborg Felber, geb. Hobmeier

Josef Felber

1981	Abitur (Adolf-Weber-Gymnasium, München)
1981 - 1987	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
27.5.1987	III. Staatsexamen der Tiermedizin
24.6.1987	Tierärztliche Approbation
6.11.1987	Eheschließung mit Dr. med. Wolfgang Müller

